

Humanized green fluorescent protein genes and methods

Patent number: JP2000503536T

Publication date: 2000-03-28

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/48; C07K14/435;
C07K14/47; C07K19/00; C12N15/09; C12R1/91;
C12N5/10; C12P21/02; C12Q1/02

- european: C07K14/435A5; C12N15/87

Application number: JP19970526204T 19970117

Priority number(s): WO1997US00755 19970117; US19960588201
19960118

Also published as:



WO9726333 (A1)
EP0874903 (A1)
US5874304 (A1)
EP0874903 (B1)
AU730842 (B2)

Report a data error here

Abstract not available for JP2000503536T

Abstract of corresponding document: **US5874304**

Disclosed are synthetic and "humanized" versions of green fluorescent protein (GFP) genes adapted for high level expression in mammalian cells, especially those of human origin. Base substitutions are made in various codons in order to change the codon usage to one more appropriate for expression in mammalian cells. Recombinant vectors carrying such humanized genes are also disclosed. In addition, various methods for using the efficient expression of humanized GFP in mammalian cells and in animals are described.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

【添付書類】

36 364

刊行物 6 /

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-503536

(P2000-503536A)

(43) 公表日 平成12年3月28日 (2000.3.28)

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	キーワード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/435		C 0 7 K 14/435	
14/47		14/47	
18/00		19/00	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02	C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全140頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-528204
 (88) (22) 出願日 平成9年1月17日 (1997.1.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成10年7月17日 (1998.7.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US97/00755
 (87) 国際公開番号 WO97/26333
 (87) 国際公開日 平成9年7月24日 (1997.7.24)
 (31) 優先権主張番号 08/588,201
 (32) 優先日 平成8年1月18日 (1996.1.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ
 ファウンデーション, インコーポレイ
 テッド
 アメリカ合衆国 フロリダ 32611, ゲイ
 ンズビル, グリントー ホール 223
 (72) 発明者 ソロツキン, セルゲイ
 アメリカ合衆国 フロリダ 32608, ゲイ
 ンズビル, エス. ダブリュー, 38ティエ
 イチ ストリート 3811-59
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化グリーン蛍光タンパク質遺伝子および方法

(57) 【要約】

哺乳動物細胞、特にヒト起源の細胞における高レベル発現に適合させた、合成および「ヒト化」型のグリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が開示される。塩基置換が、コドンの使用を哺乳動物細胞における発現により1つ以上の適切な使用に変化させるために、種々のコドンにおいてなされる。このようなヒト化遺伝子を保有する細胞ベクターがまた、開示される。さらに、哺乳動物細胞および動物におけるヒト化GFPの効果的な発現を用いるための種々の方法が記載される。

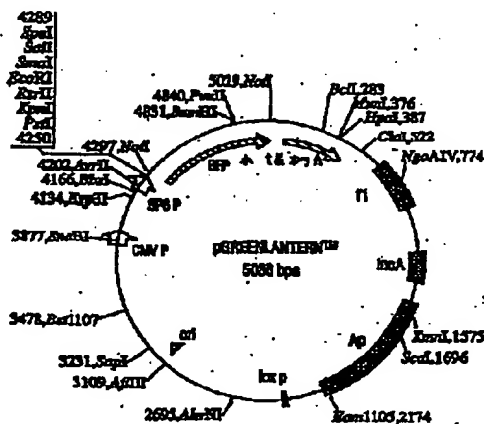


FIG. 10

3

42. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クワグ遺伝子配列と比較して、減少した数のAGAアルギニンコードコドンを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

43. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クワグ遺伝子配列と比較して、減少した数のGTA、TAA、またはTGAセリンコードコドンを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

44. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クワグ遺伝子配列と比較して、減少した数のGTTまたはGTAバリンコードコドンを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

45. 前記遺伝子が、Kozakコンセンサス配列の下流に作動可能に位置する、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

46. 前記遺伝子が、配列番号3の核酸配列を含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

47. 前記遺伝子が、タンパク質コード領域配列に作動可能に連結する、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

48. 前記遺伝子が、哺乳動物細胞において局所的なプロモーターの転写制御下に位置する、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

49. 組織発現ベクターとしてさらに規定される、請求項48に記載のヒト化GFP遺伝子。

50. プロモーターの下流に作動可能に位置するヒト化GFPレポーター遺伝子を含む、前記プロモーターが哺乳動物細胞においてヒト化GFP遺伝子の発現を誘発する、発現ベクター。

51. 前記プロモーターが構成プロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。

52. 前記プロモーターがウイルスプロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。

53. 前記プロモーターが、BSV、TL、RSV、SV40、CMV、または β アクチンプロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。

54. 前記プロモーターがCMVプロモーターである、請求項53に記載の発現ベクター。

55. 前記プロモーターが、組換えプロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。

56. 前記プロモーターが、テトラムチン、熱ショックタンパク質、メタロチオネインまたはエストロゲン遺伝子プロモーター、放射線誘導 (radiation-inducible) プロモーター、またはtelomeraseプロモーターである、請求項55に記載の発現ベクター。

57. 前記プロモーターが、組織特異的プロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。

58. 前記プロモーターが、FAB、インスリン、トランスフェリン、 α 1-抗トリプシン、PAI-1、アポリポタンパク質AII、IL-6レセプター、GIF、GFAP、GF118、または β 2ミグリン遺伝子プロモーターである、請求項57に記載の発現ベクター。

59. 前記発現ベクターが、組織のクロニング部位をさらに含む、請求項50に記載の発現ベクター。

60. 前記発現ベクターが、前記プロモーターと前記ヒト化GFP遺伝子との間に作動可能に位置された複数のクロニング部位を含む、請求項59に記載の発現ベクター。

61. 前記発現ベクターが、前記ヒト化GFP遺伝子の下流に作動可能に位置された複数のクロニング部位を含む、請求項59に記載の発現ベクター。

62. 前記発現ベクターが、制限酵素サイトをさらに含む、請求項50に記載の発現ベクター。

63. 前記発現ベクターが、第2レポーター遺伝子をさらに含む、請求項50に記載の発現ベクター。

64. 前記第2レポーター遺伝子が、第2転写単位内に含まれる、請求項63に記載の発現ベクター。

65. 前記第2レポーター遺伝子が、ネオマイシン、ヒグロマイシン、ピューロマイシン、ゼオシン、ミコフエノール素、ヒスチジノール、またはネトレキセ

ートに対する耐性を付与する、請求項63に記載の発現ベクター。

66. 前記発現ベクターが、ポリアデニル化シグナルをさらに含む、請求項50に記載の発現ベクター。

67. 前記発現ベクターが、組換えアデノウイルスベクターである、請求項50に記載の発現ベクター。

68. 前記発現ベクターが、組換えアデノウイルス (AdV) ベクターである、請求項50に記載の発現ベクター。

69. 前記発現ベクターが、組換えレトロウイルスベクターである、請求項50に記載の発現ベクター。

70. 前記発現ベクターが、配列番号3の核酸配列を含むヒト化GFPレポーター遺伝子を含む、請求項50に記載の発現ベクター。

71. 前記発現ベクターが、増強されたグリーンまたは増強されたブルー蛍光タンパク質を発現する、請求項50に記載の発現ベクター。

72. ヒト化GFP遺伝子を含む、組換え宿主細胞。

73. 前記ヒト化GFP遺伝子が、組換えベクターを用いて前記細胞に導入される、請求項72に記載の組換え宿主細胞。

74. 前記細胞が、前記ヒト化GFP遺伝子を発現し、コード化GFPタンパク質を産生する、請求項73に記載の組換え宿主細胞。

75. 前記細胞が、哺乳動物細胞である、請求項72に記載の組換え宿主細胞。

76. 前記細胞が、ヒト細胞である、請求項72に記載の組換え宿主細胞。

77. 前記細胞が、VEG、L14、CD、CD5、F135、B22、Hsp42、J13、M18、MDC、A549、PC12、B12、またはTHP細胞である、請求項72に記載の組換え宿主細胞。

78. 前記細胞が、一次胎胚の細胞である、請求項72に記載の組換え宿主細胞。

79. 前記細胞が、哺乳動物内に位置される、請求項72に記載の組換え宿主細胞。

80. 前記細胞が、配列番号3の核酸配列を含むヒト化GFP遺伝子を含む、請求

項72に記載の組換え宿主細胞。

81. 前記細胞が、所望のタンパク質を発現する組換え遺伝子をさらに含む、請求項72に記載の組換え宿主細胞。

82. 適切な非特異抗体中に、ヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを含む、レポーター遺伝子発現キット。

83. 哺乳動物細胞を培養するための方法であって、ヒト化GFP遺伝子を該細胞において発現する工程を含む、方法。

84. 細胞の集団内の哺乳動物細胞を同定するための方法であって、以下の工程：

- (a) 該細胞において、ヒト化GFP遺伝子を発現する工程；
- (b) GFPを発現しない細胞の集団と該細胞を混合する工程；および
- (c) GFP蛍光強度を同定することによって該細胞を同定する工程、

を含む、方法。

85. 外因性阻害セグメントを含む哺乳動物細胞を同定する方法であって、以下の工程：

- (a) 外因性阻害セグメントに作動可能に連結されるヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを、該細胞に導入する工程；および
- (b) GFP蛍光強度を同定することによって、該外因性阻害セグメントを含む細胞を同定する工程、

を含む、方法。

86. 前記発現ベクターが、GFPをコードする第1コード領域および前記阻害セグメントを含む第2コード領域を含む、請求項85に記載の方法。

87. 前記外因性阻害セグメントが、非翻訳産物をコードする、請求項85に記載の方法。

88. 前記外因性阻害セグメントが、選択されたタンパク質またはペプチドをコードする、請求項85に記載の方法。

89. 前記発現ベクターが、前記選択されたタンパク質またはペプチドに作動可能に連結されたGFPを含む融合タンパク質をコードする第1コード領域を含む、

4

請求項8に記載の方法。

90. 前記融合タンパク質が、細胞下の局在化シグナルを含むペプチドに作動可能に連結された配列を含む、請求項89に記載の方法。

91. 前記融合タンパク質が、細胞下の局在化シグナルを含む選択されたタンパク質およびペプチドに作動可能に連結された配列を含む、請求項90に記載の方法。

92. 前記融合タンパク質が、核膜の局在化ペプチドに連結された配列を含む、請求項90に記載の方法。

93. 前記融合タンパク質が、ミトコンドリア膜の局在化ペプチドに連結された配列を含む、請求項90に記載の方法。

94. 前記細胞が、異なるスペクトル特性を有するGFPタンパク質を含む発現する、第1および第2ヒト化GFP遺伝子を含む、請求項85に記載の方法。

95. 前記細胞が、ヒト細胞である、請求項85に記載の方法。

96. 前記GFP蛍光細胞が、蛍光活性化セルソーティングによって決定される、請求項85に記載の方法。

97. 前記細胞が、哺乳動物内に位置する、請求項85に記載の方法。

98. 哺乳動物細胞内の選択されたタンパク質の位置を決定するための方法であって、以下の工程：

(a) 選択されたタンパク質をコードする遺伝子に作動可能に連結されたヒト化GFP遺伝子を含む選択された配列を含む発現ベクターを、細胞内に導入する工程；および

(b) GFP蛍光の位置を決定することにより細胞内の選択されたタンパク質の位置を決定する工程、を包含する、方法。

99. 前記細胞内の前記選択されたタンパク質の前記位置が、外部刺激に依存する、請求項98に記載の方法。

100. 前記細胞内の前記選択されたタンパク質の前記位置が、細胞周期に依存

する、請求項98に記載の方法。

101. 哺乳動物細胞内の選択された位置にタンパク質を局在化する方法であって、以下の工程：

(a) ヒト化GFP遺伝子およびタンパク質コード遺伝子に作動可能に連結された選択されたヒト化ペプチドをコードする配列を含む選択された配列を含む発現ベクターを、細胞内に導入する工程；および

(b) GFP蛍光の位置を決定することにより、細胞内の選択されたタンパク質の位置を決定する工程、を包含する、方法。

102. 哺乳動物細胞における核膜プロモーターを局在化する方法であって、以下の工程：

(a) 核膜プロモーターの制御下でヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを、細胞内に導入する工程；

(b) 核膜プロモーターによって核ヒト化GFP遺伝子の発現を可能にするのに必要十分な条件下および十分な期間、細胞を維持する工程；および

(c) GFP蛍光細胞を決定する工程であって、GFP蛍光細胞の存在が、核膜プロモーターを示す、工程、を包含する、方法。

103. 前記核膜プロモーターが、核膜の組織特異的プロモーターである、請求項102に記載の方法。

104. 前記核膜プロモーターが、核膜の組織特異的プロモーターである、請求項102に記載の方法。

105. 前記核膜プロモーターが、哺乳動物細胞における発現について試験される核膜の遺伝子と天然に会合する、請求項102に記載の方法。

106. 前記細胞が、哺乳動物内に位置する、請求項102に記載の方法。

107. 哺乳動物細胞において、選択されたプロモーターからの転写を制御する物質を施用する方法であって、以下の工程：

(a) 選択されたプロモーターの制御下で、ヒト化GFP遺伝子を含む発現ベク

一を、哺乳動物細胞内に導入する工程；

(b) 核物質を含むと思われる組成物を、細胞内に導入する工程；および

(c) GFP蛍光細胞を決定する工程であって、GFP蛍光細胞の存在が、選択されたプロモーターからの転写を制御する物質の存在を示す、工程、を包含する、方法。

108. 前記物質が、毒素または汚染物質である、請求項107に記載の方法。

109. 哺乳動物において、選択された遺伝子の発現レベルを決定するための方法であって、以下の工程：

(a) 選択された遺伝子に作動可能に連結されたヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを、哺乳動物の細胞において発現する工程；および

(b) 該哺乳動物の細胞においてGFP蛍光を決定する工程であって、GFP蛍光のレベルが、選択された遺伝子の発現レベルを示す、工程、を包含する、方法。

110. 哺乳動物の異なる組織における選択された遺伝子の発現を分析するための方法であって、以下の工程：

(a) 天然の遺伝子プロモーターの制御下で選択された遺伝子を含む発現ベクターを、該哺乳動物の細胞内に導入する工程であって、該遺伝子は、ヒト化GFP遺伝子に作動可能に連結した、工程；

(b) 該遺伝子の発現を可能にするのに必要十分な条件下および十分な期間、該

哺乳動物を維持する工程；および

(c) 該哺乳動物の組織の断片を分析する工程であって、所与の組織におけるGFP蛍光細胞の存在が、該組織における遺伝子発現を示す、工程、を包含する、方法。

111. ヒト化GFP遺伝子を用いる方法であって、哺乳動物の組織においてヒト化GFP遺伝子を発現する工程、および該組織によって発現されるGFPを回収する工程を包含する、方法。

112. 前記ヒト化GFP遺伝子が、既知の分子量のタンパク質またはペプチドをコードする配列と融合し、そしてここで前記タンパク質が、GFP融合タンパク質

を発現する、請求項111に記載の方法。

113. 前記遺伝子が、145位のチロシンがフェニルアラニンで置換された配列番号2のアミノ酸配列を含むブルー蛍光タンパク質をコードする、請求項4に記載のヒト化GFP遺伝子。

114. 配列番号2のアミノ酸配列の66位のチロシンをコードするATG、CATで置換され、そして配列番号2のアミノ酸の145位のチロシンをコードするTAG、TTCで置換されている、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

115. 前記遺伝子が、64位のフェニルアラニンがロイシンで置換され、そして66位のセリンがトレオニンで置換された配列番号2のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードする、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

116. 配列番号2のアミノ酸配列の64位のフェニルアラニンとコードするTTCが、CATで置換され、そして66位のセリンをコードするTTGが、AGCで置換されている、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

【発明の詳細な説明】

ヒト化グリーン蛍光タンパク質遺伝子および方法

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、一般に、レポーター遺伝子の分野に關し、特に改良されたグリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子、構築物、および使用方法を提供する。本明細書中に開示される GFP 遺伝子は、好ましい塩基コドンを使用することにより、哺乳動物およびヒト細胞における発現のために適合されたヒト化 GFP 遺伝子である。

2. 関連技術の概観

レポーター分子は、遺伝子発現をモニターするために、生物学的な系において頻りに使用される。一般的に使用されるレポーター遺伝子としては、β-ガラクトシダーゼ、ネタルルフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) およびβ-グルクロニダーゼ (GUS) が挙げられる。しかし、利用可能なレポーター遺伝子は、それらの使用を制限する特定の欠点を有する。頻りに遭遇する制限は、マトリックスの導入が必要とされることである。他の欠点としては、例えば、特定のタンパク質の大きさが挙げられ、これはレポーター-融合タンパク質の発現が困難であり得ることを意味する。

別の有用なストラテジーは、タンパク質を蛍光タグで標識して、インタクトな細胞におけるその後の検出および同定化を可能にすることである。蛍光標識は、免疫蛍光および蛍光アナログ組織化学とともに使用され、ここで、タンパク質の生化学およびトポロジックな、生細胞中へのマイクロインジェクションの後にモニターされる。

蛍光標識は一般に、タンパク質を標識し、そしてそれを有活性な蛍光団の反活性基と共有結合することにより達成されている。これらの方法において、色素基の化学構造および位置はしばしば制限することが困難であり、そしてタンパク質の任意の位置に標識が必要である。さらなる問題は、標識タンパク質を細胞中へ導入することである。これは、タンパク質を溶解液を通して導入する

ために、マイクロインジェクション技術または可溶性透過化の方法を含む。

蛍光タグ化タンパク質に対する分子生物学的代替物は、最近の進歩およびグリーン蛍光タンパク質 (GFP) のクローニングにより可能となった。クラゲ *Aequorea victoria* 由来の GFP 10 遺伝子によりコードされるグリーン蛍光タンパク質 (GFP) は、青色光 (395 nm で主要ピーク) を吸収し、そして緑色光 (509 nm で主要ピーク) を発する。238 アミノ酸のタンパク質である (Morin および Hastings, 1971; Ward, 1980; Prasher, 1992)。GFP ヘキサペプチド発色団はアミノ酸 64 において始まり、そして、このヘキサペプチド内のセリン・チロニドヒドロキシ・グリシンの酸化を介して一次アミノ酸配列から誘導される (Shimomura, 1973; Cody, 1993)。

光刺激性 GFP 蛍光は、可逆性であり、そしていかなる抽出も、マトリックスも、*A. victoria* 由来のさらなる遺伝子産物も必要としない (Chalfie, 1994)。このことは、有意味な遺伝子発現が達成される限り、*A. victoria* 以外の生細胞における GFP の検出を可能にする。従って、GFP の小さな大きさおよび発色の「リアルタイム」検出は、GFP をレポーター遺伝子としての使用のための有望な候補にする。

改変されたスペクトル特性を有する特定の GFP 改変体は、最近報告されている。

例えば、Beja (1994) は、青色蛍光を発し、そして Tyr64 のかわりにヒスチジンを含む改変体を記載した。Beja (1995) は、さらに、*Escherichia coli* のスペクトルにずっとより近いスペクトルを有する Ser65→Tyr GFP 改変体を記載した。これは、*Aequorea* GFP の、より長波長のピークの 1 モノマー当たりの吸収係数の 10 倍より大きな 1 モノマー当たりの蛍光係数を有する。

しかし、特定の改良にもかかわらず (例えば、上記の改変体)、GFP の現在の有用性は、哺乳動物細胞における発現、よくても低い発現レベルにより、なお制限されている。それゆえ、GFP 技術における新たな開発が、このタンパク質の完全な能力が実現される前に、特に、哺乳動物細胞における発現を必要とする適用 (遺伝子治療ストラテジーを含む) において、必要であることは明らかである。

ある。

発明の要旨

本発明は、従来技術に固有のこれらおよびその他の欠点を、哺乳動物およびヒト細胞における発現のために適合されたヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を提供することにより、克服しようとする。本発明のヒト化 GFP 遺伝子は、ヒト細胞における使用のために好ましいコドンを用いた配列中に組み込むことにより誘導される。ヒト化 GFP 発現構築物ならびにヒト化 GFP およびベクターの種々の使用方法もまた提供される。

従って、本発明は、ヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子ならびにそのような遺伝子の作製および使用の方法を提供する。本明細書中で使用される用語「ヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子」は、少なくとも一つ、そして好ましくは二つ以上を、そして最も好ましくは有意な数のクラゲ GFP のコドンと、ヒト細胞においてより頻りに使用される一つ以上のコドンで置換することにより、哺乳動物またはヒト細胞における発現のために適合された遺伝子を意味する。

本発明のヒト化 GFP 遺伝子は好ましくは cDNA であるが、ゲノムコピーは決して除外されない。ヒト化 GFP 遺伝子はまた、好ましくは、*A. victoria* GFP 遺伝子から導出されたヒト化 GFP であるが、他の GFP 遺伝子供給源もまた、除外されない。

特定の実施形態において、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードするヒト化 GFP 遺伝子を提供する。

他の実施形態において、ヒト化 GFP 遺伝子は、おおむね前記の配列に基づくが、特定の改変を有する GFP 改変体をコードする。特定の例は、55 位のセリンがスレオニンで置換された配列番号 2 のアミノ酸配列を有する GFP をコードするヒト化 GFP 遺伝子である。

さらなる例は、64 位のチロニンがヒスチジンで置換された配列番号 3 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードするヒト化 GFP 遺伝子である。

別の例は、64 位と 65 位との間の発色配列 Ser Tyr Gly Val Glu (配列番号 4) が配列 Ser Gly Tyr Gly Val Leu (配列番号 5) で置換された配列番号 2

のアミノ酸配列を有する GFP をコードするヒト化 GFP 遺伝子である。

ヒト化 GFP 遺伝子の例外的な例もまた、本発明内に含まれる。しかし、アミノ酸配列における一つ以上のアミノ酸置換、またはカルボキシル末端からの約 10 もしくは 15 アミノ酸まで短縮された改変体は、蛍光タンパク質の発現に關しては一般に有用であるとは考えられない。それゆえ、コードされる GFP は、最小で約 22 アミノ酸であるべきであり、約 238 アミノ酸のタンパク質が一般に好ましい。

本発明のヒト化 GFP 遺伝子はまた、少なくとも約 10% のそのコドン位置がヒト化コドンを含む遺伝子により定規される。すなわち、それらは、ヒト細胞において頻りに使用されないコドンのかわりに、ヒト細胞において優先的に使用されるコドンを含む。

他の実施形態において、ヒト化 GFP 遺伝子は、少なくとも約 15%、約 20%、約 25%、約 30% または約 35% の、ヒト化コドンの存在により定規されるコドン位置を有する。

少なくとも約 50% またはそれより多くのコドン位置がヒト化コドンを含むヒト化 GFP 遺伝子もまた意図される。

本発明の好ましいヒト化 GFP 遺伝子は、特定の重要な変化 (key change) を含む遺伝子である。例は、クラゲ GFP 配列のコドン位置は、53、55、125、150、178、185、238、239、および 242 に位置する 10 のコドンからの少なくとも 7 つのヒト化コドンを含む遺伝子である。

好ましくは、ヒト化 GFP 遺伝子は、クラゲ GFP 配列のコドン位置は、53、55、125、150、178、185、238、239、および 242 に位置する 10 のコドンから、少なくとも 8、少なくとも 9、または 10 のヒト化コドンを含む。

そのような例外的な例は、ヒト化ロイシンコドン GTG (TC、または TTG のいずれか) 一つを、GFP 遺伝子配列のコドン位置は、53、125、178、185、および 238 において含むヒト化 GFP 遺伝子により例示される。さらなる例は、ヒト化バリンコドン GTG を、GFP 遺伝子配列のコドン位置 53、150、および 238 において含むヒト化 GFP 遺伝子である。他の例は、ヒト化セリンコドン TTT を、GFP 遺伝子配列のコドン位置 20 において含むヒト化 GFP 遺伝子である。

本発明により包含されるヒトc-fos遺伝子はまた、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して増加した数のGCCまたはGCTアラニンコードコドンを含む遺伝子を含む。

用語「配列番号1」の野生型クラダ遺伝子配列に比較して増加した数のコドン」は、ヒト配列が、配列番号1の野生型クラダ遺伝子配列のコード領域内に存在する同じアミノ酸をコードするコドンに比較して、配列番号2のアミノ酸配列、または本項箇書きに記載の変異をもしくはその他の等価物の1つをコードする別のコード領域内の特定のアミノ酸をコードする、増加した数のコドンを含むことを意味する。従って、用語「増加した」が、この関連で使われる場合、コード領域の本項箇書きへの1つ以上のコドンの付加を意味するのではなく、むしろコード領域内のいずれも以上のコドンのヒトまたは哺乳動物細胞における無効のためにより好ましいコドンでの置換を意味することが理解される。

上記の定義に照らして、本発明のヒト化β内因子または、配列番号1の野生型クラダベータ内因子配列と比較して、増加した数のGCTGステインコードドロン；増加した数のGCTGスバランギンコードドロン；増加した数のGAGグルタミン酸コードドロン；増加した数のGTTCフェニルアラニンコードドロン；増加した数のGCTGグリシンコードドロン；増加した数のGCTGヒスチジンコードドロン；増加した数のGCTGイソロイシンコードドロン；増加した数のAGGリファンコードドロン；増加した数のGCTもしくはGCTGロシニンコードドロン；増加した数のAGCスバランギンコードドロン；増加した数のGCTもしくはGCTGプロリンコードドロン；増加した数のGGGタミニンコードドロン；増加した数のGCT、AGCもしくはGCTGアルギニンコードドロン；増加した数のGCTもしくはGCTGセリンコードドロン；増加した数のAGCセレオニンコードドロン；増加した数のGCTもしくはGCTGトリニンコードドロン；および/または増加した数のTAGトリニンコードドロンを含む置換子として定義される。

特定の発露塩酸において、ヒト化pH遺伝子はまた、TGA終止コドンを含み得る

ヒトHsp70遺伝子はまた、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、減少した数の特定のコドンを含むことにより定義され得る。この関連での「減少

1つ以上の特定のペプチドが付着されたタンパク質、タンパク質サブユニットなどをコードする遺伝配列を含む。

組織とベクターおよびプラスミドは、本研究の目的を重要な局面を形成する。そのようなベクターにおいて、ヒトHIVの感染因子は、プロモーター（一般に、嗜乳動物またはヒト細胞において作用可能なあらゆるプロモーター）の転写制御下に配置される。「転写制御下に配置される」は、ヒトHIVの感染が、プロモーターの下流にそして転写制御下に配置される。その結果、そのプロモーターが、嗜乳動物またはヒト非細胞組織に設置される保タンパク質の発現を、ベクターのそのような組織中の導入に際して、所定とせ得ることを意味する。

従って、本発明の組織型ベクターは一般に、プロモーターの下流に作製可能に配置されたヒト化のレポーター遺伝子を含む。ここで、プロモーターは、哺乳動物またはヒト細胞におけるヒト化遺伝子の発現を誘導させる。好ましくは、プロモーターは、細胞における特定の環境後にグリーン蛍光を誘導することによる遺伝子の発出を可能にする十分な遺伝子の発現を誘導する。従って、このようなプロモーターは、哺乳動物およびヒト細胞において「作動可能」である。

本発明による発現ベクターおよびプラスミドは、1つ以上の構成性プロモーター（例えば、転写を促進するもの）とくに一般に活性である、ウィルスプロモーターまたは哺乳動物転写因子由来のプロモーター）を含み得る。構成性ウイルスプロモーターの例としては、*HSV*、*EB*、*EBV*、*SV40*、および/またはプロモーターが得られる。この中で、*CMV*プロモーターが現在好ましい例である。構成性哺乳動物プロモーターの例としては、*β*アクトチンプロモーターより例証されるような数々のノンスピーディング遺伝子プロモーターが挙げられる。

誘導性プロモーターおよび/または調節エレメントまたは、本発明の発現ベクターとの使用のために含有される。適切な誘導性プロモーターの例としては、例えば、チトクロムP₄₅₀遺伝子、酪シヨクタンパク質遺伝子、メタリチオニン遺伝子、ホルモン誘導性遺伝子（例えば、エストロゲン遺伝子プロモーター）などの遺伝子由来のプロモーターが挙げられる。電導材料層の導電に際しては

した」もまた、ヒト化配列が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列のコード値

域内に存在する同じアミノ酸をコードするコドンと比較して、配列番号2のアミノ酸配列、またはその変換もしくは同義物をコードするGATコドン領域内の特定のアミノ酸をコードする、減少した数のコドンを含むことを意味する。従って、「減少した」が、いかに多い、コドン領域の任意の部分からのコドンの単純な欠失を反映するのではなく、再びGATコドンのヒト遺伝子においてより頻繁に生じるコドンでの置換をいうことが理解される。

要する、本発明のヒトtRNA^{Val}遺伝子はまた、減少した数のCCAアラニンコードコドン；減少した数のGGGグリニンコードコドン；減少した数のCTT、CTAもしくはCTTロイシンコードコドン；減少した数のAGAアルギニンコードコドン；減少した数のAGT、TCAもしくはTCCセリンコードコドン；または減少した数のGTTもしくはGTGバリンコードコドンを含む遺伝子として定義される。

必須とされるとは考えられてはいないが、ヒト化ポリ遺伝子が、ヒト化遺伝子配列の上流に作動可能に配置された Kozak コンセンサス配列を含む（すなわち、遺伝子が Kozak コンセンサス配列の下流に配置される）ことが現在好ましい。

特定の好ましいヒト化ヒアルロン酸塩は、配列番号 3 の配列決定を含む。しかし、これは決して限定ではなく、そして本発明のまさに一つの例示的な実施態様である。多くの他のそのようなヒト化ヒアルロン酸塩をいかにして作製および使用するかについての詳細な情報は、本明細書中に含まれている。例えば、多数の適切なヒト化ヒアルロン酸塩のいずれか一つを作製するに及んで、表 2、表 3、および表 4 の例解が与えられよう。

本発明の組成物においてトヒ化された遺伝子はまた、他のタンパク質コード領域に作用可能に置換される。これは一般に、そのような核酸断片の発現産物に、融合タンパク質の産生を生じる、N末端およびC末端の両方の融合タンパク質が置換される。

実質的に任意のタンパク質もしくはペプチドコード順配列、またはその組み合わせが、融合タンパク質をコードするためにヒト化pE配列に融合される。これは、恒的化ペプチド、治療的タンパク質、阻害剤発現のためのタンパク質、

性化されるプロモーター (例えば, *os*, *luc*, および *egr-1*) もまた誘導される。テトラサイクリンに感受性である *tet* 誘導プロモーターが現在好ましい例である。

組織特異的プロモーターおよび／または調律エレメントは、特定の実施形態において有用である。本発明の発現ベクターと使用されるそのようなプロモ-タ

一の例としては、肝臓脂肪代謝（ β 酸化）タンパク質遺伝子（結核上皮に特異的）；インスリン遺伝子（ β 細胞に特異的）；トランスフェリン（transferrin） α_1 、 α_2 -アンダーソン病、プラスミノーゲン活性化因子（ α ） α_1 （PAI-1）；アポリポrotein（ α ）およびリポセアゼ遺伝子（肝臓膜に特異的）；ミエリン塩基性タンパク質（MBP）遺伝子（中枢神経組織に特異的）；グリセロール酸基タンパク質（ α ）遺伝子（神経膠細胞に特異的）； α - α （ α ） α_1 （ α ）の塩酸化に特異的）；ならびに神経組織に特異的である神経特異的エノラーゼ（NSE）プロモーターが挙げられる。

発現ベクターおよびプラスミドの構築および使用は、当業者に周知である。従って、実質的に任意の哺乳動物細胞に発現ベクターが、本明細書に開示されるヒト化遺伝子に関連して使用される。

所ましいベクターおよびアドレスは、少なくとも1つのマルチクロッキング
部を有して構成する。特定の実施形態においては、発振ベクターは、プロモ
ータと互に位相関係に配列との間に作動可能に配列されたマルチクロッキング
部族を含む。このようなベクターは、他の実施形態におけるその使用に加え
て、第2のプログラムコード領域にセグメントを、それが1つ以上の部族と連続的
なタイミングパターンであるように、マルチクロッキング部族間にクロッキングす
ることにより、1つ以上のタイミングパターンを制作するために使用される。

筋の実施形態において、発現ベクターは、発現可能ヒト化gfp遺伝子配列のF
領域に作動可能に位置されたマルチクロニング部位を含み、これらのベク
ターは、それらの使用に加えて、第2のタンパク質コード配列セグメントを、それ
がヒト化gfp配列と連続的かつインフレームであるように、マルチクロニング
部位中にクローン化することにより、C末端融合タンパク質を構築することにお

6

いて有用である。

その中に第2のタンパク質または配列コード領域セグメントもまた存在するベクターおよびプラスミドはまた、もちろん、複製セグメントそれ自体の性質にかかわらず、本発明により包含される。

第2のレポーター遺伝子が、本発明の発現ベクター内に含まれる。第2のレポーター遺伝子は、第2の転写単位内に含まれる。適切な第2のレポーター遺伝子としては、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ゼオシン (zeo⁺)、ミコフェノール酸、ヒスチジン耐性およびメトトレキサートのような薬剤に対する耐性を与える遺伝子が挙げられる。

発現ベクターはまた、15Sエレメント、ポリAデニル化シグナル、スプライスドナー/スプライスアクセプターシグナルなどのような他の複製配列を含み得る。

適切な発現ベクターの特定の例は、組換えアデノウイルス、組換えアデノ随伴ウイルス (AAV)、または組換えレトロウイルス等を使用する発現に適合されたベクターである。とりわけ、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、および欠陥型痘苗ウイルスもまた使用される。

特定の実施態様において、発現ベクターまたはプラスミドは、配列番号3の複製配列を有するヒト化pT7レポーター遺伝子を含み得る。

レポーター遺伝子発現キットもまた提供される。このキットは一般に、適切な容積手段中に、ヒト化pT7遺伝子を含む少なくとも1つの発現ベクターまたはプラスミドを含む。ベクターまたはプラスミドは一般に、哺乳動物またはヒト細胞における発現後のグリーン蛍光によるpT7の発現を可能にするに十分な量のpT7を発現し得るベクターまたはプラスミドである。

組換え宿主細胞は、本発明の例の局面を形成する。そのような宿主細胞は一般に、少なくとも1コピーのヒト化pT7遺伝子を含む。発現目的のために好ましい細胞は、哺乳動物およびヒト細胞である。しかし、他の細胞が本発明の細胞型から除外されないことが理解される。従って、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、および植物細胞のような細胞もまた可能であるが、その上

ず、少なくとも1コピーのヒト化pT7遺伝子またはベクターを含む全ての細胞が挙げられる。

特定の実施態様において、配列番号3の複製配列を含むヒト化pT7遺伝子を含む組換え宿主細胞が提供される。

ヒト化pT7遺伝子を使用する多数の方法が、本発明により提供される。哺乳動物またはヒト細胞を、細胞内で少なくとも1つのヒト化pT7遺伝子を発現することにより原液またはタグ化する方法は、各方法の中心である。ヒト化pT7遺伝子は、好ましくは、pT7蛍光を検出することによる細胞内のpT7の存在を検出を可能にするに十分な量のpT7を産生するはずである。

細胞の局面内で哺乳動物またはヒト細胞を固定する方法もまた提供される。このような方法はまず、一般に、蛍光によるpT7検出を可能にするに十分な量のpT7を産生するために有効な形式で、細胞内で少なくとも1つのヒト化pT7遺伝子を発現する工程を包含する。次いで、細胞はpT7を発現しない細胞の集団と混合されるか、または自然に混合させ、続いてこの細胞が、pT7蛍光細胞を特定する手段により同定される。

本発明書中で使用される用語「pT7蛍光細胞」は、細胞中のpT7からのグリーン蛍光を検出することによる細胞の確率的な検出を可能にするに十分な量のpT7の生成を生じるために有効な形式でヒト化pT7遺伝子を発現する細胞を意味する。

本発明はさらに、外因性pT7セグメントを含む哺乳動物またはヒト細胞を同定するための方法を提供する。この方法はまず、一般に、外因性pT7セグメントに作動可能に連結されたヒト化pT7遺伝子を含む発現ベクターを哺乳動物またはヒト細胞に導入する工程を包含する。次いで、細胞は、グリーン蛍光によるpT7検出を可能にするに十分な量のpT7を産生するために、好ましくは、ヒト化pT7遺伝子の発現を可能にするに有効な条件下および期間で培養される。引き続いて、外因性pT7セグメントを含む細胞を結果的に同定することは、pT7蛍光細胞を同定することにより達成される。

これらの方法は、本発明の例 (たとえば、アンチセンス核酸分子、リボゾーム

うな細胞は発現目的のためには好ましくない。

特定の実施態様において、組換え宿主細胞は好ましくは、細胞がpT7を、最も好ましくはpT7のその蛍光による検出を可能にするに十分な量で、発現する、または発現するように刺激されることを可能にするに有効な形式で、ヒト化pT7遺伝子を組み込む。従って、組換え宿主細胞は好ましくは、組換えベクターにより細胞中に導入されたヒト化pT7遺伝子を含む。

特定の実施態様において、組換え宿主細胞は、ヒト化pT7遺伝子を発現して、コードされるpT7タンパク質を、好ましくはpT7のその蛍光による検出を可能にする

に十分な量で、産生する。約20コピーほどのヒト化pT7遺伝子を含む細胞が、しばしば、pT7のそのグリーン蛍光による検出を可能にするに十分な量で、pT7タンパク質を発現することが望まれる。特定の実施態様において、約10コピー、約5コピー、またはたった約1もしくは2コピーほどのヒト化pT7遺伝子を含む細胞もまた、特にヒト化pT7遺伝子が染色体遺伝子である場合、所望される発現基準を満たし得る。他の実施態様において、組換え宿主細胞は、約10時間の培養期、そして好ましくは約5時間以内、そして最も好ましくは約6時間以内またはより短い期間以内に検出可能なpT7タンパク質を産生するために、ヒト化pT7遺伝子を発現し得る。

適切な組換え宿主細胞の例としては、V29細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株の細胞、COS細胞 (例えば、COS-7)、ならびにB15、B16、B16G、3T3、3T3L、MDCK、A549、PC12、K562、および293細胞が挙げられる。

哺乳動物から細胞を取り出し、そして細胞を固定された期間培養した後に固定された細胞細胞株の細胞もまた、本発明の細胞内に含まれる。これらの細胞は、人の手により加工され、そしてそれがもともと回収された同じ宿主細胞に戻される。ヒト化pT7遺伝子を含むそのような細胞は、その位置にかかわらず、本発明の範囲内に入る。

当然、組換え細胞はまた、遺伝子治療により提供されたような、動物またはヒト被験体の身体内に位置する細胞を含む。これらの細胞としては、遺伝子が提供された細胞 (例えば、トランスフェクション、感染などによる) にかかわら

ず、または他の細胞) をコードする外因性pT7セグメントを同定するために、および細胞動物 (例えば、選択されるタンパク質またはペプチド) をコードする外因性pT7セグメントを同定するためにまた適切である。

特定のこのような実施態様において、このような方法での使用のための発現ベクターは、pT7をコードするヒト化pT7遺伝子として規定される第1のコード領域を含み、そしてまた外因性pT7セグメントを含む第2のコード領域を含む。これらのベクターは、一般に、少なくとも2つの転写ユニットまたは翻訳ユニットを含むベクターとして公知である。2つの転写ユニットは、それらのそれぞれの下流遺伝子の発現を案内する3つのプロモーターを天然に含む。

外因性pT7セグメントを含む哺乳動物またはヒト細胞を同定する方法はまた、

選択されるタンパク質またはペプチドに作動可能に連結されたpT7を含む融合タンパク質をコードする第1のコード領域を含む発現ベクターを用いる使用に適切である。このベクターは、選択されるタンパク質またはペプチドに作動可能に連結されたpT7を含む融合タンパク質を発現する。本発明のこれらの局面は、一般に、必ずしも排他的ではないが、細胞動物をコードする外因性pT7セグメントの検出を確証する。

このような形式で発現される融合タンパク質は、細胞下の sub-cellular 局在化シグナル (例えば、膜結合的ペプチドまたはミトコンドリア局在化ペプチド) を含むペプチドに作動可能に連結されたpT7を含む。融合タンパク質はまた、細胞下の局在化シグナルを含む選択されるタンパク質およびペプチドの両方に作動可能に連結されたpT7を含み得る。

このような同定方法は、以下に記載されるような考慮において種々の目的でインビトロで実施される。これらの同定方法はまた、インビボで実施され得、ここで細胞は、哺乳動物またはヒト被験体内に位置される。

2つ以上のヒト化pT7遺伝子 (各々が異なるスペクトル特性を有するpT7タンパク質を発現する) が、上記の形式で細胞内で検出される。1つ、2つ、またはそれ以上のいずれかのヒト化pT7遺伝子が発現するpT7蛍光細胞は、種々の方法により同定される。この方法は、免疫蛍光および蛍光活性化セルソーティング (FACS)

(5)を含む。

本発明の方法のさらなる例は、哺乳動物細胞またはヒト細胞内での選択されるタンパク質の位置を決定するための方法である。これらの方法は、一般に、選択されるタンパク質をコードする遺伝子に作動可能に連結されたヒト化GFP遺伝子を含む変換を含む変換ベクターを細胞に導入する工程を含む。このベクターは、一般に、選択されるタンパク質に作動可能に連結されたGFPを含む融合タンパク質を発現する。ここで、この融合タンパク質は、GFPのグリーン蛍光を放出することによる細胞の検出を可能にするために十分な量で産生される。次いで、GFPからのグリーン蛍光の位置を測定することにより、細胞内の選択されるタンパク質の位置が測定される。

これらの方法は、細胞内での選択されるタンパク質の位置を決定するために適

切であり、ここで、この位置は、外部刺激（例えば、熱、低濃度、塩、またはホルモン、サイトカイン、神経伝達物質などのような種々のアゴニストの存在）に依存すると知られるかまたは考えられる。これらの方法はまた、細胞内の選択されるタンパク質の位置を決定するために適切であり、ここで、この位置は、細胞周期における変化の間、細胞の老化の間、およびアポトーシスなどの間に存在するような内部シグナルに依存すると知られるかまたは考えられる。

本発明の方法のさらなる例は、タンパク質を哺乳動物またはヒト細胞内の選択される位置へ局在化するための方法である。これらの方法は、一般に、ヒト化GFP遺伝子の領域配列エレメントに作動可能に連結されそしてそれに連結する標的化ペプチド（これはまた、タンパク質をコードする領域配列エレメントに作動可能に連結されそしてそれに連結する）をコードする領域配列エレメントを含む変換を含む変換ベクターを細胞に導入する工程を含む。このようなベクターは、GFPおよびタンパク質に作動可能に連結された標的化ペプチドを含む融合タンパク質を発現する。ここで、この融合タンパク質は、GFP蛍光を放出することによって細胞の検出を可能にするために十分な量で細胞内で産生される。次いで、タンパク質は、細胞内の選択される位置に局在化され、そしてその位置が、グリーン蛍光の位置を検出することにより確認される。

される。次いで、細胞が、所定のプロモーターからの転写を抑制することが知られるかまたは疑わしい物質を含むことが疑われる組成物に曝される。次いで、細胞は、活性プロモーターが、GFP由来グリーン蛍光を放出することによって細胞検出を可能にするために十分な量でGFP融合タンパク質産生を促進することを適宜可能にする期間、培養または維持される。次いで、引き続くGFP蛍光細胞の測定は、所定のプロモーターからの転写を抑制する物質の元の存在を示す。

これらの方法はまた、インビトロおよびインビボでの使用に適切である。インビトロでの使用は、毒薬および汚染物質のような物質が、ヒト化GFP遺伝子/標的化タンパク質の適切なプロモーターを使用することにより検出されることを可能にする。

遺伝子治療の部分として、局在される哺乳動物またはヒト細胞内の遺伝子発現レベルを決定することがしばしば必要とされる。本発明はまた、このような発現レベルを決定するための方法を提供する。これらの方法は、一般に、選択される遺伝子に作動可能に連結されたヒト化GFP遺伝子を含む変換ベクターを動物の細胞内で発現させる工程を含む。変換ベクターは、好ましくは、GFP融合タンパク質を発現するベクター、またはヒト化GFP遺伝子および局在されるタンパク質遺伝子がそれぞれ同一または異なるプロモーターを使用するベクターのいずれかである。プロモーターは、好ましくは、インビトロでの検出を可能にするために十分なGFP発現を生じることが示されている。次いで、動物の細胞内のGFP蛍光が決定され、ここで、GFP蛍光のレベルは動物内における選択される遺伝子の発現レベルを示す。

これらの方法は、哺乳動物またはヒト組織の異なる組織内の選択される遺伝子の発現を分析するための方法を提供するように適合される。このような方法は、一般に、天然の遺伝子プロモーターの制御下で選択される遺伝子（ここで、この遺伝子は、ヒト化GFP遺伝子に作動可能に連結される）を含む変換ベクターを哺乳動物の細胞内に導入する工程を含む。ベクターは、好ましくは、GFPに作動可能に連結されたコード遺伝子産物を含む融合タンパク質を発現し、この融合タンパク質は、GFPのグリーン蛍光を放出することによる細胞検出を可能に

本発明に関連する方法のさらなる例は、哺乳動物またはヒト細胞内の細胞プロモーターを試験するための方法である。

これらの方法は、一般に、細胞プロモーターの制御下でヒト化GFP遺伝子を含む変換ベクターを細胞に導入する工程および細胞プロモーターによるヒト化GFP遺伝子の発現を可能にするために有効な条件下および十分な期間で細胞を維持する工程を含む。「有効な条件」および「十分な期間」は、既知の操作性なプロモーターを使用する場合に、グリーン蛍光によるGFP検出を可能にするために十分な量で産生されるGFPを適宜生じるそれらの条件および時間として定義される。

適切な条件下で細胞を維持した後、ついで、任意のGFP蛍光細胞が測定される。ここで、GFP蛍光細胞の存在は、測定される細胞内での発現結果物における活性プロモーターを示す。

これらの方法は、細胞膜結合性プロモーターを分析するため（ここで、このプロモーターは、哺乳動物またはヒト細胞の細胞内で試験される）；および細胞の結合性プロモーターを分析するため（ここで、このプロモーターは、一般に、条件の制御下で試験される）に適切である。本明細書中で使用される用語「細胞膜結合性プロモーター」は、特定の組織中で特異的に遺伝子発現を指向するプロモーターおよび所定の組織中で遺伝子発現を低発的に指向するプロモーター（これはまた、「組織特異的」プロモーターと名付けられる）をいうために使用される。反接プロモーターはまた、哺乳動物またはヒト細胞内での発現のために試験される細胞遺伝子と天然に適合するプロモーターであり得る。

これらの方法はさらに、インビトロおよびインビボでプロモーターを分析するために適切である。ここで、後者の場合、細胞は、哺乳動物またはヒト組織体内に位置される。

プロモーターの文脈において、ヒト化GFPを使用するための方法のさらなる例は、哺乳動物またはヒト細胞内の選択されるプロモーターからの転写を抑制する物質を検出するそれらの方法である。さらに、一般に、所定のプロモーターの制御下でヒト化GFP遺伝子を含む変換ベクターが、哺乳動物またはヒト細胞内に導入

するために十分な量で産生される。遺伝子の発現を可能にするために有効な条件下および十分な期間で哺乳動物を維持した後、次いで、哺乳動物の組織の細胞が、GFP蛍光細胞を放出するために分析され、ここで、所定の組織内のGFP蛍光細胞の存在は、組織内の遺伝子発現を示す。

ヒト化GFP遺伝子が使用されるさらなる例は、GFP自身の組成成分である。ヒト化GFP遺伝子を使用することのさらなる方法は、特に、哺乳動物またはヒト細胞内でヒト化遺伝子を発現する工程およびその細胞により発現されるGFPを回収する工程を含む。

これらの方法は、以下の工程を含むように、より完全に記載される：

- (a) ヒト化GFP遺伝子が哺乳動物またはヒト細胞内で発現可能なプロモーターの制御下で位置される、変換ベクターを調製する工程；
- (b) 変換ベクターを哺乳動物またはヒト細胞内に導入する工程；
- (c) コード化グリーン蛍光タンパク質（GFP）の発現を可能にするために有効な条件下および十分な期間で宿主細胞を培養する工程；および
- (d) その発現されたGFPを回収する工程、および、好ましくは、他の細胞性タン

パク質の十分な量を有さないGFPを複製する工程。

このような方法の適合化は、ヒト化GFP遺伝子が、公知の分子量のタンパク質またはペプチドをコードする領域配列と融合されることを含む。従って、宿主細胞による発現は、蛍光分子マーカーとして使用され得るGFP融合タンパク質を生じる。このような蛍光分子マーカーの範囲は、分子量決定キットを作用するためにこのように産生される。

図面の簡易な説明

以下の図面は、本発明の明細書の部分を形成し、そして本発明の特定の局面をさらに示すために含まれる。本発明は、本明細書中に提示される特定の実施形態の詳述と組み合わせた一つ以上のこれらの図面を参照してより良好に理解される。

図1、gfp10 cDNAのヌクレオチド配列および決定アミノ酸配列、各コメンの上は、アミノ酸の一字表記である。gfp10配列内に導入された変異は、下のgfp10

pTegs-IFPシリーズは、2つのレポーター遺伝子セットであるGFPおよびlacZ（それぞれ自身のプロモーターおよびリポーター遺伝子シグナルを有する）を含む。これらの2つの低発現単位は、独立に大腸菌（GFPに対してはXgal-Hell）誘発。そしてlacZに対してはSalI誘発）。これは目的の遺伝子発現のためのクロニングペースを増大させる。このように使用される場合においてさえも、このベクターは、1 kbまでの別の遺伝子単位を適合させる。

さらに、考えられた用途型または組織において特定のプロモーターの発現はまた、ベクターがXgalおよびlacZで誘発した後、pTegs-IFPベクターの設計はまた、IFPエレメントの使用により、レポーター-gfp遺伝子およびリポーター由来の目的の遺伝子レポーターの発現を可能にする。

さらに、本発明者らは、IFPエレメントの制御下で、ヒト化IFPレポーター遺伝子を有するMycタグベクターの構築物を記述する。Mycタグは検出可能なIFP誘発。代表的なIFPおよび特定のIFPの発現を示した。GFPの発現は、迅速で簡便なMycタグクロニング選択を、他のプラークと区別することと可能にする。

ヒト化IFPはまた、他のウイルスおよび非ウイルスベクターおよび発現系に取り込まれる。本発明のヒト化遺伝子およびベクターを使用して、哺乳動物およびヒト細胞におけるgfp遺伝子発現の効率的な導入および発現が可能である。

これは、本明細書に記載されるように、モルモット眼の神経感覚細胞内のインビトロの遺伝子発現により、説明される。ヒト化gfp遺伝子は、蛍光活性化細胞選別（FACS）による細胞選別、およびヒト遺伝子発現におけるような多くの使用を有する。

実際、本明細書に記載された系は、哺乳動物細胞の組織において、組織FACS選別による抽出を可能にするのに十分な感受性レベルの効率的な遺伝子の導入および発現を媒介することが示される。GFPのような基質で誘発された細胞の選択。あるいはβガラクトシダーゼのような酵素活性の可視化のための細胞の選択は、このように、説明される。MYCおよびlacZは、同様に、非常に広範な宿主細胞を有するため、記載されたベクターは、ヒト遺伝子発現を含む、多数の

、実質的に切断されたgfp遺伝子は、特に有用であることが示唆されない。しかし、このようなタンパク質のための1つの使用は、それに続く抗体産生のための、哺乳動物細胞における高レベルのGFP産生であり得る。

2. グリーン蛍光タンパク質

AequoreaGFPは、235アミノ酸残基のタンパク質である。その最大の蛍光ピークは、475nmでより小さなピークを有する355nmである。これらのピークの増幅（すなわち、蛍光係数）は、それぞれ1〜30および7〜15nm/cm²と互換性がある（Morrisら、1974）。355nmでの吸収は、505nmにおいて最大発光を生じる。量子収率は光子の両方の効率。一旦光子が吸収されると、0.72-0.85（Bairdら1974）であり、そして励起状態の持続時間は1.25nsである（Pereraら、1988）。

GFPは、非常に安定なタンパク質であるため、それらのスペクトル特性が変性条件下で比較的安定なタンパク質である。誘発されたタンパク質はまた、数時間にわたって、ほとんどのプロテアーゼに耐性がある（Baird、1982; BairdおよびRakema、1982; CutlerおよびBaird、1993）。しかし、変性の際、GFPがその発光を失う。

（Bairdら、1993）。中性水性緩衝液において、発光を半減させる温度は、AequoreaGFP（Baird、1981）の場合、75°Cであると見られている。Aequorea GFPは、80°C（2分間）、80°Cでの熱変性または80°Cでのアルカリ化の処理を使用すれば、発光が全て失われて変性されるが、GFPを還元して発光を回復させることが可能である（BairdおよびRakema、1982）。この還元には、チオールが必要であるようである（SimpsonおよびBaird、1983）。

Serfs、Tyrell、およびWangの酸化ならびにチロシンの1.7%水酸化により形成される、GFP変性体。p-ヒドロキシジリジンミダゾリンを形成するために、別のAequoreaタンパク質に対する絶対的な必要性はない。この変性体の再構築は、GFPが、遺伝子発現の変化を報告するスピードにおける極めてである。

変性タンパク質または変性体を含む準備ベクトルは、光を吸収するが、実質的に非発光である（Bairdら、1993）。というのは、おそらく、むき出しの発色団が

遺伝子迅速技術において有用である。

1. グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子

グリーン蛍光タンパク質遺伝子および遺伝的タンパク質は、表1に示されるように、個々の生物体において、存在していると考えられる。このような遺伝子が発見する任意の生物発光細胞動物および植物由来のgfp遺伝子は、本発明によって、ヒト化gfp遺伝子を調整するための出発点として使用される。

表1

グリーン蛍光タンパク質 (GFP) を発する生物発光細胞および植物動物

門/綱	属	参考文献
刺胞動物	Aequorea	MorrisおよびBasilga, 1971
	Obelia	MorrisおよびBasilga, 1971
	Phialidium	MorrisおよびBasilga, 1971
	Nitrocras	Praschke, 1995
	*Campanella	MorrisおよびBasilga, 1971
	*Clusia	MorrisおよびBasilga, 1971
ヒドロコリ	Stromalia	MorrisおよびBasilga, 1971
	*Diptyca	MorrisおよびBasilga, 1971

刺胞動物	Amelia	Wamplerら、1973
	Phyllosora	Wamplerら、1973
花虫綱	Stylaster	Wamplerら、1973
	Acanthaster	Wamplerら、1973

インビトロのグリーン蛍光から推測されるGFPの存在

現在、A. victoria由来のgfp遺伝子配列が、容易に入手可能であるため、ヒト化gfp遺伝子を作成するためのテンプレートとして使用されることが好ましい。

gfp遺伝子配列の生物学的に機能的同等物がもちろん、本発明に包含されるが、遺伝子を切断するための試みが、発光が消失する前に、たった1つの残基がアミノ酸末端。そして10または15以下残基がカルボキシ末端から犠牲にされることを示した（DopfおよびBorlaug、1995）ことを示すべきである。それゆえ

、構造でもないか、溶液分子による攻撃から保護されてもいないからである。発色団形成は、もちろん、いずれの有用なGFP変異または融合体において保護を保持したままではなければならない。

酵母およびE. coli細胞では、37°Cで発現されるGFPは、15°Cで発現されるGFPよりも発光が強い。したがって、適切に成熟したGFPの発現レベルまたは明るさを低減させることによるよりはむしろ不適当な成熟化を生じさせることにより作用する（Linら、1995）。

蛍光フィルターで励起した野生型Aequorea GFPは、同様の発光分子よりも約10倍強い。355nmへの励起の交換は、役に立たない。というのは、このような変異は、迅速な光異性化を生じ、そしてまたバックグラウンド自己発光より励起するからである。

3. GFP変異体および変異

本発明A. victoriaからクローニングされるGFPは、上述のような強い明るさ、タンパク質合成と蛍光発現と融合体光異性化との間の最適なバランスを含むいくつかの最適ではない特性を有する。しかし、GFPは、これらの欠点を軽減するか克服するため、および励起および発光波長がシフトされ、異なる色および新しい用途を作成するための、第二世代の化合物を提供する目的のために再構築される。

GFPにおけるほとんどの変異体は、相対的な発光または発光ピークにおいて顕著な変化のない、発光の部分または完全な欠損を生じる。これらの変異体は、おそらく、タンパク質の折り畳み、発色団の形成不全、または不十分な発光による発光の喪失（quench）を起因する。遺伝子を切断する試みは、発光が消失する前に、1つの残基のみアミノ酸末端から犠牲にされる。そして10または15以下の残基がカルボキシ末端から犠牲にされることを示した（DopfおよびBorlaug、1995）。主要なランゲーションに対するGFPの非変異は、おそらく、それはごくわずかではない。というのは、タンパク質発現は、発色団を合成し、そして同様の水から直接に遊離されなければならない。

GFPポリペプチドにおけるアミノ酸置換は、異なるスペクトル特性を有するタンパク質を生じることがすでに報告されている。変異体のリブセットは、おそらく

く発色団の脱プロトン化を促進するか、または阻害する。395nmおよび475nmにおける吸光度ピークの割合に影響する。例は、T2031 (Thr→Ile) およびE222G (Glu22→Gly) であり、これらは、それぞれ、395nmまたは475nmのいずれかにあいて単一の吸光度ピークに対するスペクトルを単純化する (Ehrigら、1995)。変異体1167T (Ile→Thr) は、2つのピークの野生型の割合を、どちらかを完全に増減させることなく変換させる (Ehrigら、1994)。

第二の変異体のサブセットは、実質上、有意に変化した特徴を有する新しい発色および発光スペクトルを生産する。この型の変異体の例は、発色領域そのものの中に見いだされる。

(a) Tyr残基変換

Aequorea由来のGFPおよび海シクラリア*Renilla reniformis*のGFPは、同一の発色団を共有し、さらにAequorea GFPは395nmおよび475nmに2つの吸収ピークを有するが、*Renilla* GFPは、438nmにおける単一の吸収ピークのみを、Aequoreaタンパク質の主な395nmピークよりも約1.5倍強いモノマー発光強度で、有する。多数の変異の適用について、*Renilla* GFPのスペクトルは、AequoreaのGFPよりも好ましくあり得る。というのは、異なる蛍光と共鳴エネルギー移動の放出との間の波長の差は、狭い吸収スペクトルが、狭くかつ広いよりはむしろ高く低い場合、より簡単であるからである。

さらに、Aequorea GFPのより長い波長の吸収ピーク (475nm) は、発光フィルターセット (set) にとって好ましい特性であり、そして光漂白に抵抗性であるが、光漂白により感受性であるより短い395nmの吸収ピークより、低い値を有する (Chalfieら、1994)。前述の理由のため、Aequorea GFP発光スペクトルの単一ピークへの変換は、このまじくは、より長い波長が望まれる。

このような変換は、GFP変異体および変換されたスペクトルを有するGFP変異体を準備するスクリーニングを促進したEhrigら (1994) により達成された。中心チロシン (Tyr) の側鎖芳香アミノ酸 (Tyr、IleまたはPhe) による置換は、発色および発光スペクトルを進行的により長い波長にシフトさせる。

Ehrigら (1994) は、ヒドロキシルアミン処理 (SikorskiおよびBocke, 1991)

を用いて、そして0.1M NaCl、50mM GTP、および700mMのGTP、GTPおよびGTP (Chalfieら、1992) を用いるPheTyrの置換率を増加させることによってGFP cDNAのランダム変異誘発を実施した。増殖上のコロニーは、475nm/395nmにおいて発色され、キセノンランプで照射され、そして出力ビームが全体の培養液を照射するために必要とするためのモノクロメータで波長を付与する場合、異なる発色および発光の割合について系統的にスクリーニングされる。

野生型タンパク質の種と対比的にGFPおよび発光のブルーにより発色可能な変異体は、Ehrigらにより準備された (1994)。最大発色および発光は、野生型GFPの最大発色および発光から、それぞれ、14および40nmの波長的にシフトされた。決定的なタンパク質の変異体は、発色団の中心にTyr66→Ileへの置換を含んだ。Tyr66Ileの低光スペクトルは、タンパク質が、変化するまでの置換には敏感ではなく、このことが、発色団が極度に接近可能でないこととさなる証拠を提供する。

トリプトファンおよびフェニルアラニンのチロシンのさらなる置換は特異的な変異誘発が実施された (Ehrigら、1994)。トリプトファンは、チロシンとヒスチジンとの間の中間の発色および発光波長を与えたが、わずかな発光のみであり、これは、おそらく、新しい置換または発色団形成が不十分である一方で、フェニルアラニンは発色可能な蛍光を与えなかったためである。

Tyr66→Ile変異体は、野生型GFPよりも発光が少ないが、これはおそらく、別のアミノ酸が、中心洞に良好に適合していないからであり、もちろん、これは置換変異体である。異なる最大発色および発光を有するGFPのいくつかの置換の利便可能性は、下記のように異なる置換子変異の2色評価、発光およびタンパク質輸送 (Trafficking) が可能となる。

(b) Ser残基変換

*Renilla*のGFPにはるかに近いスペクトルを有するGFP変異体を作製する所望はまた、Ehrigら、(1995)の研究を促進した。AequoreaGFPのアミノ酸配列のセリン63は、Gluヒドロキシベンズリデンイミダゾリノン発色団の部分となる。Ser63がピニル基を形成するためのさらなる脱水素化を実施するという仮説をEhrig

するために、Ehrigら、(1995) この変異体はAla、Leu、CysまたはThrに変異させた。ピニル基が部分的または部分的に除去により形成される場合、SerおよびCysは、除去が不可能なAlaおよびLeuとは異なる異なる同一のスペクトルを与えるはずである。

Ehrigら (1995) は、その結果、同じ分子重なり野生型GFPのそれよりも4倍から6倍強力である、470–490nmに位置づけられる単一の吸収ピークを有する4つの変異体を作製した。これらの結果は、ピニル形成を排除する。Ser63→Thr変異体は、さらなる特徴付けのために選択された。というのは、これが発色および発光の最も長い波長 (490nmおよび510nm) であり、*Renilla* GFP (495nmおよび505nm) について報告される発色および発光波長に非常に類似しているからである。

新生のポリペプチド鎖から発光を産生するための決定的な置換変換は、野生型タンパク質 (Ehrigら、1995) におけるより、GFPにおいて約4倍迅速に進行した。この加速は、迅速な置換下置換のためのレポータータンパク質としてのGFPの使用における潜在的に重要な置換を改善する。

Ser63のArg、Asn、Asp、PheおよびTyrへの変換は、発光強度を野生型の強度よりはるかに低くした。

まとめると、Ser63Thr GFP変異体 (Ehrigら、1995) の有利な特性は、以下を含む：各々が、その最も長い波長ピークにおいて発色される場合野生型より約6倍

より強い強度；野生型より4倍迅速な置換変換への置換；および光感受性が低いことおよび非常に強い光漂白のみ。前述の発見は、Ser63Thrが、空気乾燥したGFPの懸濁液中で、438nm照射における約7分の1の発光率で光漂白する。Ser63Thrの発色強度は、これらの条件下で約7分の1の発光であるので、Ser63Thrの光漂白の量子収率は、約4分の1の発光であると計算される。

これらの利点は、長波長発色または光感受性が必須である場合以外ほとんど適用について、Ser63Thrを、野生型より強力なものにする。これは、特に、一般に入手可能な発光イソシアネート (FITC) フィルターセット (450–480 nm照射) を使用するより高度な感受性を提供する。

(c) 緑の着色シフト変異体

DeLagrangeら、(1995) はまた、GFP発色4–10の異なるランダム変異誘発を実施し、そしてスペクトルが上記のSer63変異体に類似する6つの変異体を選択した。そのうち4つは、上記の形質した位置で同じ置換基 (Leu、CysまたはAla) を有した。

スペクトル的にシフトしたGFP変異体の構築のためにDeLagrangeら (1995) によって使用された方法は、以前に最適化した組み合わせた変異誘発およびデジタル画像分光分析 (DIS) (GoldmanおよびTowres、1992；DeLagrangeおよびTowres、1995) を使用してスペクトル的に異なる個々のバクテリオクロロフィル結合タンパク質を産生するために使用されている。

DISは、空間的に解析したスペクトル情報を得ることにより、ペトリ皿での数千のコロニーを直接に同時スクリーニングを可能にする (Towresら、1995；Towres、1994)。異なる成長で設計したペトリ皿の両側は、荷電共役デバイス (CCD) カメラによりとらえられ、そして置換測定を校正するソフトウェアによりさらに処理される。最適化された組み合わせの変異誘発およびDISを用いて、さらなるGFP変異が準備される。

DeLagrangeら (1995) のコンビナトリアルライブラリースクリーニングにおいて、変異誘発のために簡略化したGFP置換は、Phe64とGlu69 (Phe Ser Tyr Gly Val Glu；配列番号4) との間の6つのアミノ酸配列であり、これは、発色団の

も含む。変異オリゴヌクレオチドは、66位に芳香アミノ酸を取り込むことを行い、他の5つのコドンには完全にランダムになるようにランダムに置換された。変異誘発のために使用されるオリゴヌクレオチドの配列は、CyberScopeコンピュタープログラムを用いて得られた。

得られた約3×10⁵の変異GFP遺伝子のライブラリーは、M13 (DIS) で発現された。ペトリ皿上の数千のコロニーを、DIS (DeLagrangeら、1995) を用いた発光によりスクリーニングした。スペクトル的にシフトした変異体は、最初に、490nm光で照射した場合に観察されるグリーン発光により同定される。これは490nmで照射した場合に消失する。対比的に、野生型GFP発光は、490nm照射よりはるかに明るい。DISは、104コロニーにつき約1個が機能発光タンパク質を発現する

ことを明らかにした。

DeLagrangeら(1995)は、いくつかの単色シフトGFP(ESGFP)クローンを創出し、そして配列決定した。Tyr(1および2)GFPは、保存されているように見られたが、他の4つの部位はより少なくストリメンメントであった: Ser55Fは、観察される変異型には必要ではなかった。ESGFPは、容易に野生型GFPから区別される。なぜなら、その最大吸収は、野生型Aequorea GFPにおける390nmからESGFPにおける430nmと、約100nm赤色シフトするからである。1つの特定のクローンはESGFP4であり、これは、発色団配列Met Gly Tyr Gly Val Leu(配列番号5)を有する。ESGFP4の発光は、ほとんど野生型GFPの発光と同一であるが、発光スペクトルが非常に異なる。

DeLagrangeら(1995)は、この配列特徴が指紋的アンサンブル変異型(Espectral Ensemble Mutagenesis)(EEM)および再アンサンブル変異型(Recursive Ensemble Mutagenesis)(REM)戦略(DeLagrangeおよびYounis, 1993; DeLagrangeら, 1993)によるさらなる操作に影響を受け、多スペクトルの発光タンパク質の「レインボー」を断片的に産生することを可能にした。ESGFP4はEEMにより最適化された新しいコンビナトリアルライブラリーを構築することにより、重要な変異体の頻度が、顕著な発光シフトを有する稀有クローン(rare clone)の単離を可能にするのに充分高くなることが予測される。

4. ヒト化gfp遺伝子

野生型GFPの特性が変異体において、上記のように改善されるにも関わらず、野生型GFPは、各々のタンパク質分子が数々の発色団または発光分子を生成する際の断片的レポーター基に組み入れられる組織の1つの段階を欠落している。各々のGFPが、GFP発現の比較的低レベルな1つの発光団を産生する、発光当たり100個の分子が、明るさの信号を上げるのに必要であり得る(Chishtiら, 1995)。

上記は、本発明の重要な(哺乳動物およびヒト細胞における増加したGFP発現のために提供される本発明の構成)を説明する。上記の変異体の各々または所望の変異体または変異体のパネルがまた、本発明で提供されるようにヒト化バック

グラウンドにおいて調製される。これは、本発明のヒト化局面が、タンパク質の配列を断片的に変換するからである。

哺乳動物細胞におけるGFPを発現する以前の試みは、Kozak配列(Adamsら, 1995)を使用してきた。このように変換したgfp遺伝子は、哺乳動物発現ベクターに挿入され、CDO-K1細胞(Adamsら1997)において使用されてきた。Pines(1995)はまた、一過性のGFP発現(CO-7, HeLa, およびHep2)3T3細胞を報告している;そしてKisilevsky(1995)は、GFPのインタクトな細胞におけるミトコンドリアにおける発現を報告している。しかし、これらの研究は、比較的純粋な発現を反映していると考えられており、さらに、多量の毒素により得られたネガティブな結果と対照されると考えられる。これらの少ないポジティブな結果は、細胞に導入された高コピー数のgfp遺伝子の結果であると考えられる。

本発明者によりとられたアプローチは、Adamsら(1995)の方法に反対であり、そして哺乳動物細胞における発現により適切であるようにコンド使用を改良するために、最も重要な含むKozak配列を使用することによってヒト細胞環境におけるGFP mRNAの質的な翻訳効率に起因する。このようなヒト化構築物を使用することにより、ヒト化gfp遺伝子の低コピー数(例えば、10以下の範囲で、そして特定のヒト化gfp変異遺伝子を使用した場合に1または2でさえも有り得る)を有する細胞におけるグリーン発光を生じる。

ESGFP4の量と、タンパク質発現速度における各々のコドンの相対との間の

相対は、E. coli、酵母、および他の生物体(BennettらおよびHall(1992); Granthamら, (1980); Granthamら(1981); Ikemura(1981a; 1981b; 1982); Tsudaら(1990))について記載されている。しかし、コドン変換が実際に、任意の与えられた遺伝子で行われるまで、それらの翻訳効率および全体の発現レベルへの影響は確立され得ない。これは、Kozak配列に隣接する状況に類似しており、これは、予測にも関わらず特にgfpの哺乳動物細胞における発現増加に寄与するとは考えられていない。本発明者らがヒト化gfp遺伝子発現について効果的であることを示した現在、GFP技術の有用性が顕著に増進される。

クラゲgfpを本発明に従ってヒト化するために、本発明者らは、まず、gfp遺伝

子のコドンの詳細な分析を行った。表2は、クラゲgfpコドンとヒト遺伝子で共通に置かれるコドンとの間の比較の結果である(Adamsら, 1995)。これが、本発明者らが、gfpと一時的なヒト遺伝子配列との間の重要な差異を特定し、そしてそれらを交換を可能にすることを可能にした。

本発明による、ヒト化配列の例は、配列番号3によって示される。しかし、本発明のヒト化配列は配列番号3の代表的な配列には全く限定されないことが理解される。むしろ、以下の指示により、当事者が、多数の異なるヒト化gfp配列を容易に調製し得る。

ほとんど使われないクラゲのコドンモヒト遺伝子でより頻密に使用されるコドンで置換した変換は有用な変換であると考えられるが、特定のコドン変換は、もちろん、能率よりも好まれる。この意味で、本発明者らは、ヒト遺伝子においてほとんどまたはほとんど全く使われない多数のgfpコドンを同定した。下記のように、このようなコドンは、本発明によるヒト化遺伝子を産生するために変換される第一の候補である。

一時的なヒト化変換体を作製するにおいて、ヒト化されるべきコドンは、本明細書中の表3に示される表3および表4において示される情報を調べることから当事者によって同定される。例えば、表2における情報を利用するにおいて、当事者は、ヒト遺伝子において通常に使用されるそれらのコドンの頻度に対してクラゲコドンの頻度を比較し、そして任意の適切な変換を行う。例示のためだけに、アミノ酸ロイシンを考えると;コドンCUUは、gfp遺伝子中で11回使用されるが

このコドンは、ヒト遺伝子において4番目に好ましいにすぎないコドンに相当する。ロイシンコドンUUAまたは、クラゲ遺伝子において重要な特徴を示し、そしてこのコドンはヒトゲノムにおいて使用するための最適な選択である。従って、ロイシンコドンを改変することは、ヒト化遺伝子を調製するために適切な開始点となる。

表2の分析に従ってなされるさらなる改変は、アルギニンコドンのAGA(これはヒトゲノムにおいて4番目の選択にすぎない)をより好ましいコドン(例えば、

AGAまたはAGG)に改変すること;セリンコドン(例えば、AGCまたはAGU)を、より好ましいコドン(例えば、GCGおよびAGC)に改変すること;スレオニンコドンをAGUに最適化すること;プロリンコドンGCCの使用を避けること;アラニンコドンGCUを最も好ましいヒトコドンGCUに改変すること;酸性なグリシンコドンGGAおよびGGUの使用を避け、そしてそれらをヒト遺伝子において好ましいコドンGCGおよびGGCに置換すること;炭素に出現するバリンコドンUUAおよびUUGを改変し、そしてその代わりにコドンUUG(これはヒトゲノムにおいて明らかに好ましい)を使用すること;およびイソロイシンコドンUUAを避け、そしてこれを好ましいコドンAGUに改変することである。

2つのコドンの選択しかないアミノ酸において、本発明者らは、ヒトゲノムと比較した場合、野をgfp遺伝子は最も好ましくないコドンを含まないことに気付いた。従って、適切な変換が以下のコドンにおいてなされる:リジンに対するAAA;グルタミンに対するCAA;ヒスチジンに対するCAU;グルタミンに対するGAA;アスパラギンに対するGAG;およびフェニルアラニンに対するUAC;そして、これらをAGG, CAG, CAC, GAG, GACおよびUACにそれぞれ置換する。

さらなる改変もまた、表3および表4における情報を考慮することからなされる。これらの改変は、容易に使用される形式で、コドン優先度に関する重要な情報を提供する。表3は、本発明のヒト化gfp構築物における使用について好ましいコドンの一覧を提供する。表4は、図1との相互参照を便利にするために、T(チミン)よりもU(ウリジン)を記入込んだ全く同一の情報である。

表3: ヒト使用について好ましいgfpコドン

アミノ酸	ヒト遺伝子において好ましいコドン						
アラニン	Ala	A	GCC	GCT	GCA	CCG	
シスチン	Cys	C	TGC	TGT			
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAT			
グルタミン酸	Glu	E	GAG	GAA			
フェニルアラニン	Phe	F	TTC	TTT			
グリシン	Gly	G	GGC	GCG	GGA	GGT	
ヒスチジン	His	H	CAC	CAT			
イソロイシン	Ile	I	ATC	ATT	ATA		
リジン	Lys	K	AAA	AAA			
ロイシン	Leu	L	CTG	CTC	TTG	CTT	<u>GTA</u> <u>TTA</u>
メチオニン	Met	M	ATG				
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAT			
プロリン	Pro	P	CCC	CCT	CCA	CCG	
グルタミン	Gln	Q	CAG	CAA			
アルギニン	Arg	R	CGC	AGG	CGG	AGA	CGA
セリン	Ser	S	AGC	TGC	TCT	AAT	TCA
スレオニン	Thr	T	ACC	ACA	ACT	ACG	
バリン	Val	V	GTC	GTT	GTG	TTA	
トリプトファン	Trp	W	TGG				
チロシン	Tyr	Y	TAC	TAT			

左のコドンは、ヒト遺伝子における使用のために最も好ましいコドンを示し、ヒト使用頻度は右に示すように減少する。

二重下線コドンは、ヒト遺伝子においてほとんど使用されないコドンを示す。

表4：ヒト使用のための好ましいコドン

アミノ酸	ヒト遺伝子において好ましいコドン						
アラニン	Ala	A	GCC	GCT	GCA	CCG	
シスチン	Cys	C	TGC	TGT			
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAT			
グルタミン酸	Glu	E	GAG	GAA			
フェニルアラニン	Phe	F	TTC	TTT			
グリシン	Gly	G	GGC	GCG	GGA	GGT	
ヒスチジン	His	H	CAC	CAT			
イソロイシン	Ile	I	AUC	AUU	ATA		
リジン	Lys	K	AAA	AAA			
ロイシン	Leu	L	CUU	CUC	UUG	CUU	<u>GUA</u> <u>UUA</u>
メチオニン	Met	M	AUG				
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU			
プロリン	Pro	P	CCC	CCU	CCA	CCG	
グルタミン	Gln	Q	CAG	CAA			
アルギニン	Arg	R	CGC	AGG	CGG	AGA	CGA
セリン	Ser	S	AGC	UCC	UCU	AUU	UCA
スレオニン	Thr	T	ACC	ACA	ACU	ACG	
バリン	Val	V	GUC	GUG	GUU	<u>GUA</u>	
トリプトファン	Trp	W	UGG				
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU			

左のコドンは、ヒト遺伝子における使用のために最も好ましいコドンを示し、ヒト使用頻度は右に示すように減少する。

二重下線コドンは、ヒト遺伝子においてほとんど使用されないコドンを示す。

表3および表4における情報を用いることから、当発明は、クラゲgfpコドン TA, TTA, TGG, およびTGA (またはTAA, UGA, UAG, またはUAA) は、より好ましいコドンに改変されるべきであることを容易に認識する。一般的に、本発明では、5および6列目に挙げられるコドンは、ヒト化遺伝子を構築するにおいて、改変することが望まれるコドンを一般的に示す；4列目に挙げられるコドンもまた、ヒト化遺伝子を構築するにおいてしばしば改変されるべきである；3列目に挙げら

れるコドンは、全体において作製されることが望まれる改変の数に依存して、およびコードされる特定のアミノ酸に依存して改変されても改変されなくてもよい。1および2列目に挙げられるコドンは、野生型gfp配列に存在する場合、二つのコドンの選択しか利用可能ではない場合ではない限り、一般に適切であり、そして改変を必要としない。しかし、2列目のコドンを1列目のコドンで置換することは、特に二つのコドンの選択しかない場合、間違いない有用な選択である。この情報を用いて、gfp配列に改変を導入する場合、可能な部位はどこでも1列目のコドンを導入することが一般に望まれる。

前述の議論を考慮して、配列番号3の特定の配列は、本発明によって包含される多くの作製可能なものの一つであるにすぎないことは明白である。配列番号3において、33コドンは一つ以上の塩基置換を含む。332アミノ酸をコードする配列からの33コドンは、約10%の改変を示す。しかし、コドンの約10%を改変することは、発現レベルにおける有用な増大を生成し、従ってこのような遺伝子配列は本発明の範囲内にあることが推定される。クラゲgfp配列内のコドンの約15%、約20%、約25%、または約30%を改変することもまた有用であると考えられ、そして本発明のヒト化遺伝子は、上記範囲内にあるこれら遺伝子配列を含む。

特定の発現環境において、導入したコドン改変の性質に依存して、gfp遺伝子のコドン使用頻度における10%改変をすることさえ必要ないかもしれない。例えば、10の最も好ましいコドンの各々が改変され、そしてヒト遺伝子における使用に最も好ましいコドンで置換される場合、得られる配列はヒト細胞および哺乳動物細胞において十分な発現を達成し得ることが推定される。22列目から33コドンを改変することは、約4%の改変パーセントを示す。従って、以下の条件—すなわち、与えられた数の改変のみをなす場合、gfp遺伝子配列のコドン位置は、5

3, 93, 125, 150, 173, 195, 208, 238, および244にある10のコドンを改変することが一般に望まれることを考慮すると、いわゆる「4%ヒト化遺伝子」はまた、本発明の範囲内にある。多くの改変とともに、これらの主要な改変をなす場合、これらのコドンの少なくとも約7, 8, または9を改変することは、改善

された発現を伴うヒト化遺伝子を生じるに十分である。上記のように、ロイシンは、好ましくは、CTG, CTT, またはTTGによってコードされ；バリンは、好ましくは、GTGによってコードされ；そして、セリンは、好ましくは、AGCによってコードされる。

約4〜5%、約10%、約20%、または約30〜35%のコドンが改変されたgfp遺伝子配列は一般に好ましいが、所望される場合、さらなる改変がなされるべきではないという理由はない。従って、本発明に使用ヒト化遺伝子配列は、完全なコドン領域内の約5%、約10%、約20%、約30%、または約40〜45%のコドン位置でヒト化コドンを含む配列であり得る。なおさらなるヒト化改変を導入することを目的として配列番号3を検討すると、さらなる最適化改変が導入される多くの位置が特定される。これらは、例えば、配列番号3のコドン位置8, 9, 14, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 31, 33, 34, 35, 36, 40, 45, 50, 51, 62, 71, 83, 93, 101, 102, 111, 115, 116, 122, 120, 122, 123, 134, 136, 142, 157, 171, 173, 174, 181, 183, 186, 209, 216, 217, 229, および239で見出されるコドンを含む。

5. グリーン蛍光タンパク質の使用

レポーター分子としてのgfpの可能性は、迅速な検出（グリーン蛍光タンパク質は、標準的な長波長光源を使用する照射で検出される）；インビトロのリアルタイム検出の可能性；マトリックスの導入を必要としない事実；および細胞的に小さな大きさ（23, 9kDa）および単量体の性質（これは、タンパク質融合を容易にする）のような特性から生じる。

本発明のヒト化gfpは、これらの方法のいくつかに応答性よりも応答性を有する。従って、ヒト化gfp遺伝子は細胞に導入された細胞を、例えば、蛍光活性化セルソーティング (FACS) または蛍光顕微鏡によって測定するために；インビトロ

でおおよびインビトロで遺伝子発現を測定するために；多量産物における特定の細胞を標識するために、例えば、細胞系を研究するために；融合タンパク質を標識し、そして位置づけるために；および細胞内輸送 (trafficking) などを研究するために、使用される。

の標準的な生物学的な適用は、見逃されべきではない。例えば、タンパク質グルコシル化スタンプロット上の分子量マーカーとしてのその使用、蛍光計およびFACS装置のキャリブレーションにおけるその使用、ならびに細胞および組織へのマイクロインジェクションにおけるその使用。

蛍光分子質量マーカーを産生する方法において、一般に、ヒト化前体遺伝子配列は規定されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする一つ以上の遺伝子配列に融合され、そして融合タンパク質は発現ベクターから発現される。発現は、マーカーとして使用され得る規定された分子重（完全なアミノ酸の大きさの計算に従う）の蛍光タンパク質の産生を生じる。

好ましくは、制限蛍光タンパク質は、サイズ分画（例えば、ゲルを使用することによって）供される。次いで、未知のタンパク質の分子量の測定は、蛍光標準からの検定曲線を作製し、そして曲線から未知の分子量を読みとることによって行われる。

(b) 異なる呈色化配列

上記のように、異なる呈色形状を生産するヒト化配列におけるアミノ酸置換は、複数のレポーター遺伝子の同時使用を可能にする。異なる呈色化ヒト化配列は、融合細胞培養物において複数の細胞集団を特定するために、または複数の細胞集団を区別するために簡単に使用され得、これはさらなる試験を増加するかまたは細胞を特定するからしくは細胞を除去する必要がある場合にリアルタイムにおいて可視化される細胞変動または細胞動態における差異を可能にする。

他の選択は、単一細胞、組織、または器官内の複数のタンパク質の最終的な位置の追跡および決定、同一の細胞、組織、または器官において2つの異なるプロモーターからの遺伝子発現を測定するディフュゼンシャルなプロモーター分析；および融合細胞集団のFACSソーティングを含む。

細胞内でタンパク質を産生するにおいて、ヒト化配列タンパク質は、フ

ルオレセインおよびローダミンに類似した形式で使用され、そして相互作用タンパク質またはサブユニットをタグ化し、次いで、その関連性はインタクトな細胞において蛍光共鳴エネルギー転移によって化学的にモニターされる（Adams

、1991；1993）。

スベクトルで分離可能なヒト化配列配列を用いて使用される技術は、共焦点顕微鏡、フローサイトメトリー、ならびにモジュラー検出および二重検出技術を使用する蛍光活性化セルソーティング（FACS）によって例示される。

(b) トランスフェクトされた細胞の同定

ヒト化配列が使用される多くの技術は、特定の広い領域に分類され得る。まず細胞を簡単に同定すること。これらの方法において、ヒト化配列は、細胞において配列を発現するために簡単に使用される。この方法についての一つの使用は、細胞を異なる細胞集団の存在する環境に曝露する前、または曝露した細胞集団または細胞の細胞の集団における使用である。元の細胞のみでの配列の検出によって、このような細胞の位置を決定し、そして全集団と比較することが可能になる。

第2の方法は、目的の細胞集団でトランスフェクトされた細胞に同定に類似する。外因性配列でトランスフェクトされた細胞を同定することは、多くのインビトロ実験環境において必要とされ、そしてまたインビトロ環境においても必要とされる。

この一般的な第1の例は、コードされたタンパク質を配列を用いて直接的に同定するために、選択したタンパク質をコードする配列配列にヒト化配列が融合される場合である。細胞においてこのようなヒト化配列融合タンパク質を発現することにより、容易に検出され得る蛍光性タグ化タンパク質の産生を生じる。これは、タンパク質が選択した宿主細胞によって産生されていることを簡単に確認するにおいて有用である。それによってまた、選択したタンパク質の位置を（これが天然の位置を遊しているのかまたはタンパク質が人の手によってオルガネラに局在化されたかどうかを）決定することが可能になる。

外因性配列でトランスフェクトされた細胞はまた、融合タンパク質を作製することなく同定され得る。ここで、この方法は、少なくとも2つの転写または翻訳

単位を含むプラスミドまたはベクターを受容した細胞の同定に依存する。第1の単位は、所望のタンパク質をコードし、そしてその発現を指示し、一方、第2の単位は、ヒト化配列をコードし、そしてその発現を指示する。第2の転写または

翻訳単位からの配列の同時発現は、ベクター含有細胞が検出され、そしてベクターを含有しない細胞から区別されることを確実にする。

(c) プロモーターの解析

本発明のヒト化配列はまた、哺乳動物細胞におけるプロモーターの解析に利用される。配列は、哺乳動物細胞およびヒト細胞において発現され得、そして容易に検出され得るので、ある細胞のプロモーターが、所定の遺伝子、組織、または系を用いる使用のためのそれらの適合性について試験され得る。これは、インビトロ使用に（例えば、細胞発現および高レベルタンパク質産生における使用に類似したプロモーターを同定するにおいて）適合し、そしてインビトロ使用に（例えば、細胞培養試験においてまたはヒト細胞系での遺伝子発現において）もまた適合する。

文脈的な用語において、プロモーターを解析するために、コントロール細胞または系がまず樹立される。コントロールにおいて、陽性の結果は、公知でかつ効果的なプロモーター（例えば、本明細書中で記載される研究の特定の局面において好ましい配列プロモーター）を使用することによって確立され得る。候補プロモーターを試験するために、発現ベクターまたは遺伝子構築物において異なるプロモーターが存在することを除いては、全ての条件が同じである別の細胞または系が樹立される。コントロールと同じ期間および同じ条件下でのアッセイの実施後、選択的な配列レベルが測定される。これにより、候補プロモーターと参照された標準プロモーターとの強度または適合性の比較が可能になる。所定の研究において日常的に用いられる配列系を使用するにおいて、陽性コントロールは、試験プロモーターの特定の研究においては、省略してもよい。

この模式において試験され得るプロモーターはまた、組織特異的プロモーターおよび組織非特異的プロモーターを含む。組織特異的プロモーターを試験することによって、所定の組織を用いる使用に好ましいかまたは最適なプロモーターである組織の同定性のあるプロモーターから同定し、提供し得ることが可能になる。さらに、これは、インビトロおよびインビボで両方でも有用である。組織発現およびタンパク質産生において所定のプロモーターおよび所定の細胞型の組

合せを最適化することは、最も高い可能なレベルが達成されることを確実にするためにしばしば必要とされ得る。

本発明のこれらの局面は、分画細胞を用いるタンパク質産生における使用のための候補プロモーターを解析するために使用され得る。これらの実施態様において、プロモーターから発現される配列は、細胞から細胞外環境（次いで、そこで配列は検出される）におそらく分泌される。

調製性プロモーターの試験的かつ研究的使用は、本発明の別の局面を形成する。タンパク質産生の目的のための細胞発現において、細胞培養または細胞系の特定の時期で発現を誘導することが所望され得る。細胞または所定の系における所定のタンパク質の分泌を解析するにおいて、特定の条件下（例えば、特定のサイトカインまたはホルモンの存在下）でのみスイッチが入られるプロモーターを使用することはまた有用である。

調節性プロモーターを用いるヒト化配列遺伝子の使用はまた、プロモーター自身の解析にまで及ぶ。本明細書での例は、遺伝子を遊して電気の生物において発現されることが公知であるプロモーターのある例（例えば、熱ショックタンパク質と関連するプロモーター）からの特定のプロモーターの解析である。この方法において、例えば、分泌で作用可能なプロモーターは、それが哺乳動物細胞においても作用可能かどうか決定するために、そして、それゆえ、哺乳動物細胞が、分泌プロモーターのホモログをおそらく含むかどうかを決定するために、取得され得、そして哺乳動物細胞系において発現され得る。

組織特異的プロモーターおよび組織非特異的プロモーターの使用は、インビトロ環境において特に有力である。組織における細胞用遺伝子を発現させる状況において使用される場合、このようなプロモーターの使用によって、所定の組織で、所定の部位および/または規定された条件下でのみの発現を可能にする。これは、遺伝子発現を、特定の組織、組織、または領域に限定することを可能にし、そして費りの身体を通して遺伝子発現を制御する重要な利点である。癌の治療においてしばしば用いられるので、組織特異的発現を達成することは、特定の遺伝子治療（例えば、細胞傷害性因子の発現）において特に重要である。有益な

14

効果を得る等の治療用遺伝子を発現するにおいて、当然、組織特異的発現にまた、それが治療効果を最適化する点において好ましい。

適切な組織特異的および誘導性プロモーターは当業者に熟知である。例示のためのために、肝臓癌組織結合 (FAB) タンパク質遺伝子プロモーター (大腸上皮癌に特異的) ; インスリン遺伝子プロモーター (肝臓癌に特異的) ; トランスフィレン (transferrin) , α-アンチトリプシン、プラスミノーゲンアクチベーター-インヒビタータイプ1 (PAI-1) , γ-グロブリンタンパク質AおよびBの遺伝子プロモーター (骨髄腫癌において特異的または優先的な発現を指向する) が挙げられる。筋組織において活性なプロモーターとしては、ミエリン遺伝子タンパク質 (MP) 遺伝子プロモーター (神経細胞に特異的) ; グリア細胞酸性タンパク質 (GFAP) 遺伝子プロモーター (グリア細胞に特異的) ; および神経細胞に特異的である神経特異的エノラーゼ (NSE) プロモーターが挙げられる。

インビボ使用のための誘導性プロモーターは、好ましくは、生物学的に適合性な因子、好ましくは、通常、規定された動物組織において出会う因子に反応性であるプロモーターを含む。一例は、ヒトA1-1プロモーターであり、これは腫瘍壊死因子によって誘導される。さらに適切な例は、デトクローM450遺伝子プロモーター (腫瘍の増殖および他の因子によって誘導される) ; 熱ショックタンパク質遺伝子 (腫瘍のストレスによって誘導される) ; ホルモン感受性遺伝子 (例えば、エストロゲン遺伝子プロモーター) などである。

電磁放射線によって誘導されるプロモーターはまた、特定の実施形態において、特にガン治療において使用される。ここで遺伝子発現は電磁放射線 (例えば、γまたはX線) に誘導されることによってガン細胞において局所的に誘導される。電磁放射線によって誘導性である適切なプロモーターとしては、c-fos, fos, およびlucが挙げられる。

(d) スクリーニングプロトコル

本発明のヒト化gfpとともにプロモーターを使用することのさらなる例は、スクリーニングプロトコルにおけるその使用である。これらの実施形態 (これら

は、一般的にインビトロで行われる) において、遺伝子操作された細胞は組成物における特定の化合物または因子の存在を測定するために使用される。

スクリーニング実施形態において、ヒト化gfp遺伝子は同定することが望まれる因子によって誘導されることが公知であるプロモーターの下流に位置づけられる。細胞におけるgfpの発現は、正常にはサイレントであり、そして選択された因子を含む組成物に細胞を暴露することによってスイッチが入れられる。例えば、重金属、毒素、ホルモン、サイトカイン、または他の規定された分子に反応性であるプロモーターを使用するにおいて、重金属、毒素、ホルモン、サイトカインなどの存在は、容易に決定される。

前記の列挙から、本発明のスクリーニング局面は2つの基本的な面に分けられ、それは簡便に用語「生物学的」および「化学的」と呼ばれる。

生物学的アッセイにおいて、生物学的なエフェクター分子によって誘導性であるプロモーターの制御下のヒト化gfp遺伝子を含む細胞は、種々の質量的生物学的サンプル (これは血液、血清、唾液、尿、唾液などを含む) 中のこのような分子の存在を検出するために使用される。このような方法で検出可能であるこれらのエフェクター分子は、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質などの分子を含む。当然、本発明を通して使用される場合、用語「プロモーター」は、任意の調節エレメントを包含するために使用されることが理解される。本発明における特定の例は、所定の組成物中のステロイドを検出するためのヒト化gfpと併用するステロイド調節エレメントの使用 ; 炎症反応エレメント (これは、TNF, EGF, PDGF, およびIL1αによって誘導される) の調節の使用である。

いわゆる化学アッセイにおいて、化学的因子によって誘導性であるプロモーターの制御下のヒト化gfp遺伝子を含む細胞は、種々の組成物中の化学的因子の存在を検出するために使用される。これらのアッセイは、液体 (例えば、飲料水など) の毒害または汚染物を検出するために使用される。この方法で検出される因子のタイプは、重金属、毒素、および他の種々の汚染物ならびに有害な化学製品を含む。

当然、任意のスクリーニングアッセイは、所定のプロモーターからの遺伝子発現を阻害するか、加速するか、またはそうでなければ、ダウンレギュレートする

因子を検出する類似において使用されることが理解される。このようなネガティブな効果は、遺伝子発現が阻害因子の存在に反応して「スイッチを切る」場合に生じる蛍光のレベルの減少および既述された蛍光によって検出可能である。

(e) FACS分析におけるgfp

多くの慣習的なFACS法は、抗体抗体に結合した蛍光色素の使用を必要とする。蛍光色素でラベルされたタンパク質は、FACS装置における抗体に対して好ましい。なぜなら、細胞は蛍光タグ化試薬とインキュベートする必要がなく、そして抗体結合物の非特異的結合によるバックグラウンドがないからである。蛍光は安定であり、そして低毒性であり、いかなるマトリックスも抽出する必要としないので、gfpはFACSにおける使用に特に適切である。

他の発現実施形態において、所望のタンパク質は、gfp融合タンパク質を調製し、そして細胞内で発現させることによって直接的にgfpで標識される。gfpはまた、上記のように所望のタンパク質を発現する発現ベクター内で第2の転写または翻訳単位から同時発現される。また、gfpタグをタンパク質を発現する細胞またはgfpを同時発現する細胞は、FACS分析によって検出され、そしてソートされる。FACS分析は、レポーター遺伝子としてgfpを使用する場合、遺伝子発現およびプロモーター活性をモニターする有用手段として使用される。

(gfp自身もまた使用され得る) 赤方偏移gfpは、FACSを用いる使用に特に適切である。ほとんどのFACS装置で用いられるアルゴンイオンレーザーは、488nmで放射し、したがって、赤方偏移gfp変体の遺伝子 (例えば、鳥起ピークは約600nm) は、野生型gfpの赤色よりも効果的である。FACS装置を用いるgfpの首尾良い使用は、本明細書中に示される。

6. gfp融合タンパク質

ヒト化gfp遺伝子は、融合タンパク質の一部として使用される。これはタンパク質の位置を同定することを可能にする。「外因性」タンパク質とgfpの融合物は、gfpの蛍光および宿主タンパク質の機能 (例えば、生理学的機能および/または薬理学的機能) の両方を保持すべきである。

gfpのアミノ末端およびカルボキシル末端の両方は、任意の所望のタンパク質

と実際に融合され得、同定可能なgfp-融合物を作製する。野生型遺伝子を使用し、調製されたgfp-本質タンパク質の融合物の両方が報告されている (RiegおよびHagel, 1994)。gfpのカルボキシル末端へのタンパク質の融合は、リンカー配列によって増強されるかもしれない。

(a) 細胞下位

局在化研究は、細胞下位によっておよび免疫蛍光によって以前に行われてきた。しかし、これらの技術は、細胞内におけるある特定のタンパク質の位置の「スナップショット」のみを考慮する。さらに、人工的物、細胞が発光のために固定される場合、導入される。生存細胞においてタンパク質を可視化するためにgfpを使用することは、個々の細胞中で数週間を通してタンパク質を追跡することを可能にし、従って重要な技術である。

ヒト化gfpは、種々の条件下で哺乳動物細胞およびヒト細胞における細胞内タンパク質輸送をリアルタイムで分析するために用いられる。細胞を同定することから生じるアーチファクトは回避される。これらの運用において、ヒト化gfpは、その細胞下の位置を異なる天然の条件下で調べるために、公知のタンパク質に融合される。

Pines (1995) は、一過性のトランスフェクションによって哺乳動物細胞培養細胞中で発現された、gfp-サイクリンキメラを作製するためのタグとしての野生型gfpの使用を記載した。予備的な実験において、gfpならびにgfp-水塩gfp-サイクリンキメラの両方が、生細胞において検出され、そして蛍光が、このような細胞において長時間追跡された。

Pines (1995) は、サイトメガロウイルス初期プロモーターを用いて、一過性のトランスフェクトされた細胞においてgfp発現を駆動させ、そしてgfpをDSF, Bcl-2, およびNIF 17細胞において発現させた。全ての場合において、キメラは2時間後に免疫蛍光によって検出されたにもかかわらず、蛍光が検出される前にラゲ期間 (15時間) が存在した。これは、細胞中で約1時間かかるgfpが自己消化するための遅延に起因し得る (Riegら、1994)。哺乳動物細胞におけるこれらの研究とは対照的に、本発明は、gfp蛍光が約6時間検出可能であったというはっきりとした利点を有する。

Piles (1995) および他者らの研究において、GTPはタンパク質の天然の細胞下層在化を妨害しなかった。Piles (1995) は、GTPがタンパク質の細胞膜（膜および細胞質の両方）に分布していることを示した。サイクリンAにタグ化された場合、主に核に存在することが見出され、そしてサイクリンBにタグ化された場合、それはB型サイクリンに依存して核小体または小胞体と結合しながら、細胞質に存在することが見出された (Piles, 1995)。

ヒト化GTPは、実質的に任意のタンパク質をタグ化し、そして異なる条件下でタンパク質の位置を調節するために用いられる。例えば、所定のタンパク質の、減数分裂、有糸分裂、アポトーシス、または他の細胞プロセスを通じた調節において、所定のタンパク質の位置もまた、外的刺激の存在に応じて決定される。このような例は、異なる物理的条件（例えば、濃度または濃度範囲、およびさらに異なる化学的環境）を含む。用語「化学的環境」により、透過し得る天然の膜（例えば、塩または濃度範囲などの異なるレベルを有する細胞膜）およびさらにエフェクター分子が添加されている細胞膜の両方を意味する。

エフェクター分子を有する細胞膜は、所定の細胞における応答を誘発するために用いられる。本発明のヒト化GTPは、所定のエフェクターまたはアゴニストに対する細胞の応答が決定されるアクセシビリティにおいて用いられる。このような方法を用いることによって、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質、または他の因子に必要とした所定のタンパク質の位置が決定される。タンパク質の位置が、変化する外刺激によって変わることを、およびタンパク質が、細胞内（例えば、核、小胞体、サイトソーム、小胞体、および細胞膜）間を移動することを知覚できる。

(b) GTP細胞内化

GTPタンパク質の別の使用は、タンパク質の天然の行き先であるけれどもタンパク質が特定の細胞内区画への輸送に必要とされた後の標的タンパク質の特定の細胞内での輸送においてである。これを達成するために、標的化配列（例えば、核またはミトコンドリア標的化配列）は、GTP配列とともに所定のタンパク質に融合される。これは、タンパク質の天然の位置がGTPを用いて決定される上記したばかりの方法とは対照的である。

核は、その独特の膜を媒介することによって多くのタンパク質を含む。これ

らのタンパク質は、それらが生成されるサイトソルから移入される。これは、核の内部（核内腔）に到達するためには、核の外膜および内膜の両方を通り抜けて通過しなければならない。この輸送プロセスは、選択的である：サイトソルで生成された多くのタンパク質は、核から除外される。多くの核タンパク質は、孔チャンネルを拡大しながら核膜タンパク質を低圧に輸送する。孔膜上に存在するレセプタータンパク質と相互作用する。

核膜の透過性は、核移入シグナルに存在し、それは核タンパク質においてのみ存在する。核移入シグナルは、いくつかの核タンパク質において遺伝子操作技術を用いて正確に規定されている。タンパク質のどこにでも存在し得るシグナルは、正に荷電したアミノ酸リジンおよびアルギニンが豊富であり、そして高濃度プロリンを含む短いペプチド（代表的には4〜8アミノ酸残基）からなる。例えば、T抗原核移入シグナルは、Pro Pro Lys Lys Arg Lys Val（配列番号5）である。

ヒト化GTPは、標的化（この中で、異なるタンパク質が、GTPおよび核膜の細胞内に融合される）の発現の際に、選択されたタンパク質が核内に移入されたことを確認するために用いられる。これは、基礎生物学におけるインビトロ研究の一部として、またはインビボ治療の一部として（例えば、癌細胞の核への電荷の増進において）さえ用いられる。

核内化シグナルのヒト化GTP伝達子への添加はまた、発現されたタンパク質の蛍光強度も、核のよりずっと小さい空間にタンパク質を局在化することによって増強させるために用いられる。これは、本明細書中で実施例IIIにブルーGTP受容体の細胞において記載される。

核タンパク質分子は、（例えば、有糸分裂後）繰り返し移入される必要がある。その核移入シグナルペプチドは、核への移入後に切断されない。典型的に、一旦タンパク質分子が、任意の他の膜貫通オリゴマー（membrane-banded oligomer）によって移入されると、それはその核内腔で世代から世代へと受け継がれ、そして再びトランスロケーションされる必要がない。それゆえ、これらの分子上のシグナルペプチドは、タンパク質トランスロケーションの後にしばしば除去される。

ミトコンドリアは、二重膜有界オルガネラであり、電子輸送および酸化リン酸化によるATPの合成に特化されている。これらのタンパク質のほとんどは、細胞核によってコードされ、そしてサイトソルから移入される。さらに、お移入タンパク質は、それが特定の特定の小胞体と結合しなければならない。ミトコンドリアには、4つの小胞体がある：マトリックス空間；内膜；膜間空間；およびサイトソルに面する外膜。これらの小胞体のそれぞれは、異なるセットのタンパク質を含んでいる。

ミトコンドリアの生合成の研究は、酵母（融合タンパク質（相換え技術によって生成される）をコードするハイブリッド遺伝子が効率的に導入される）の使用によって進められている。ミトコンドリアマトリックスへ移入されるタンパク質は、これらが通常のポリリボソームから抽出されてから1〜2分以内に、通常サイトソルから取り込まれる。

移入されるタンパク質は、たいがいいつもシグナルペプチド（20〜40残基）をそのアミノ末端に有する。移入された後、シグナルペプチドはミトコンドリアマトリックス内の特定のプロテアーゼ（シグナルペプチダーゼ）によって迅速に除去され、次いでおそらくマトリックス内でアミノ酸に分解される。シグナルペプチドは、長くはど標準であり得る。シグナルペプチドの長さが連続的に減少される分子遺伝子変異は、1つのミトコンドリアタンパク質について、ミトコンドリア移入を台無しにするために、12のアミノ酸のものがアミノ末端で必要とされることを示している。これらの変異は、任意の細胞質タンパク質に付与し得、そしてタンパク質をミトコンドリアマトリックスへ輸送させる。

全長シグナルペプチドの物理的解析は、正に荷電した残基が全てヘリックスの側面に整列し、一方非荷電の疎水性残基が反対側に向かつて整列する、両親媒性のαヘリックス構造を形成し得ることを示唆する。ミトコンドリア移入配列の例は、Met Leu Ser Leu Arg Glu Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg Thr Leu（配列番号7）である。

ミトコンドリア膜間空間へのいくつかの膜タンパク質の輸送は、マトリックスへのそれらの最初の移送で開始される。ここで、非常に疎水性なアミノ酸配列は、電荷的に移入を促進するアミノ酸シグナルペプチドの後ろに置かれる。一

旦アミノ末端シグナルがマトリックスプロテアーゼによって切断されると、疎水性配列は、内腔にタンパク質を再移入するためのシグナルペプチドとして機能する。マトリックスからのこの移送は、おそらく内腔へのタンパク質移入に用いられる膜タンパク質の構造によって起こり、そしてこれはミトコンドリア内でコードされるタンパク質を内腔中へ移入するために用いられる機構でもある。サイトソルからミトコンドリア内腔へのタンパク質の輸送もまた、疎水性シグナルペプチドを必要とする。

生体内でのミトコンドリアの動きを可視化するためのGFPおよびミトコンドリア標的化配列の使用は、Blasillo (1995) によって報告されている。ローグミンのような色素と対照的に、GFPを用いることは、オルガネラ膜電位を喪失させる薬物によってミトコンドリア内で誘導された形態学的変化が明らかになった。

これらの研究において、Blasillo (1995) は、チトクロームCオキシダーゼのサブユニットVIの前駆体のアミノ末端アミノ酸（これは、ミトコンドリア標的化配列を形成する）をコードする短いフラグメントを融合タンパク質コード配列の一部として用いた。キメラC前駆体アミノ末端からカルボキシル末端へ、以下をコードするように作製した：ミトコンドリア標的化配列およびチトクロームCオキシダーゼタンパク質の6アミノ酸；いくつかのリジンアミノ酸；およびGFP。この融合タンパク質は、ミトコンドリアへ移入されたGFPを発現した。

ヒト化GTPの使用は、Blasillo (1995) によって記載されるタイプの研究（ここでは、単にミトコンドリアを全体として標的化することが所望されている）の改良である。ヒト化GTPはまた、選択されたタンパク質が、標的化（この中で、所望のタンパク質がGTPおよびミトコンドリア標的化配列に融合される）の発現の際にミトコンドリアへ移入されることを確認するために用いられる。ここで、ミトコンドリア標的化配列は、融合タンパク質のN末端に（コード領域の3'末端に）位置されるべきである。

7. 遺伝子治療

遺伝子治療は、一般に、遺伝的障害を矯正し得る遺伝子の宿主ゲノムへの組み込みを必要とする。宿主ゲノムにおいて、この遺伝子は、宿主細胞と共存

16

し、そして複製し、そして欠損遺伝子を修復するレベルで発現される。典型的には、皮肉は、1つまたはいくつかの段階によって最適な副作用なしに防衛される。現在までに使用された遺伝子治療に対するいくつかのアプローチがあった。これらの各々は、本発明のヒト化gfpとの組合せから選定を受け得る。

1つのアプローチは、目的の遺伝子を含むDNAを、例えば、細胞膜を化学的にまたは物理的にいすれかて透過化処理することによって、細胞中にトランスフェクトすることである。このアプローチは、一般に、一時的に身体から取り出され、そして処置の細胞傷害性に対して耐性であり得る細胞（すなわち、リンパ球）に限定される。リンパ球はシウム塩（GrubbsおよびFitzpatrick, 1978; Kippsら, 1990; 正定デキストランKopel, 1990; エレクトロポレーションGrubbsら, 1994; Potlerら, 1994）および直接マイクロインジェクションが、このような方法の例である。

特定の性質および細胞膜透過性ペプチドで形成されたリポソームまたはタンパク質複合体が、インビボおよびインビトロトランスフェクションのために使用される（Stevensonら, 1992; Torchilliaら, 1993; Zhaら, 1993; Ledleyら, 1997; Nicolaら, 1998; NicolaおよびSene, 1998）。そしてポリリジン-糖タンパク質キャリア複合体にカップリングしたDNAもまた用いられる。

この形式での遺伝子伝送の効率性は、一般に非常に低い。目的の遺伝子は、1,000〜100,000のうち1つの細胞のみのゲノムに組み込まれることが予想される。組込みの非存在下では、トランスフェクトされた遺伝子の発現は、非組込みDNAの分解に起因して、増殖細胞において数日または非増殖細胞において数週間限定される。本発明は、所望のトランスフェクトされた遺伝子をより長い時間発現する細胞を容易に特定するために使用される。

Jiaoら（1993）は、細胞膜における遺伝子の移送および発現のためのパーティクルポンパードメント風送遺伝子移送プロトコル（particle bombardment-mediated gene transfer protocol）の成功を記載する。このことは、これがこのような細胞への遺伝子移送のための効果的な方法として使用され得ることを示唆する。

プラスミドは、ヒト化gfp遺伝子物質を細胞中に直接移送するために用いられ

る状況において、本発明は、前臨床的開発段階において、そしてまた最終的な遺伝子治療をインビボでモニタリングするための両方で用いられる。

さらなる方法は、他のウイルス（例えば、ワクシニアウイルス（Jedewy, 1988; MitchellおよびSinden, 1988; Comptonら, 1990）; 欠損型肝炎ウイルス（Gervaisら, 1990; Chomazら, 1991）; アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス（AAV; Murroら, 1992; 以下を参照のこと）を用い、これらは遺伝子移送のためのベクターとして作用するように操作される。外生遺伝物質を受容し得るいくつかのウイルスは、それらが感染するスクレオチドの膜において、およびそれらが感染する細胞の範囲において限定されているが、これらのウイルスは、通常、遺伝子発現をもたらすことが保証されている。アデノウイルスは、それらの遺伝子物質を宿主ゲノム中に組み込まず、そしてそれゆえ遺伝子発現のための宿主複製を必要とせず、それらも迅速な、効果的な、異種遺伝子伝送に対して適切にしている。アデノウイルスおよびAAV（米国特許第5,121,941号、本明細書中に参考として引用される）は、本明細書中に以下に記載される。このこともまた、本発明は、前臨床的開発において、および治療の例に用いられる。

本発明の発見は、生物学的分離において周知であり、そして以下の節でさらに記載される特定の技術とともに用いられ得る。

8. 生物学的機能の等価物

先に述べたように、皮肉および皮肉がCTPの構造において不変性、そしてなお同様のまたはそうでなければ所望の機能を有する分子を得る。例えば、タンパク質構造における特定のアミノ酸が、感知し得るほどの機能の損失なしに他のアミノ酸で置換される。従って、種々の置換が、ヒト化gfpタンパク質の配列において、正確となるDNAを変更することによって、それらの生物学的有用性または活性の感知し得るほどの損失なしになされ得ることが想像される。

分子の限定された部分内でなされ得る、かつなお等価な生物学的活性の受容可能なレベルを有する分子を生じ得る変更の意に制限があるという概念が、生物学的に機能するタンパク質の構造において周知であることもまた、当業者によって十分に理解される。例えば、実質的に置換されたgfp遺伝子が生物学的に機能

得る（Millerら, 1998）。それゆえ、DNAセグメントそれ自体は、送達因子として

用いられ得る。DNAセグメントを用いるための技術は、最近開発され、そして一般に「制限クランピング」と呼ばれる（Chen, 1993）。現在、細胞が細胞のDNAを取り込み得、そしてコードされたタンパク質を発現し得ることは公知である。

この技術、およびその改良（例えば、Wangら, 1993; Tangら, 1993; Chenら, 1993; Pyranら, 1993; Wangら, 1993; およびMuller（1993）により記載され、各々本明細書中に参考として引用されるもの）の利用が、DNAを細胞の細胞に送達するために用いられ得る。非制限性、細胞透過性、および遺伝子伝達能力（Pyranら, 1993）が用いられ得る。

用いられ得る別のアプローチは、ウイルスが細胞に侵入し、それら自身の遺伝物質をそれらにもたらす天然の能力を利用する。レトロウイルスは、それらの遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、大量の外生遺伝物質を移送し、広範囲の細胞に感染し、そして特定の細胞株中でパッケージングされるそれらの能力に起因して、遺伝子送達ベクターとしての期待を有する（Miller, 1992）。

種々のレトロウイルスベクター（例えば、単純ヘルペスウイルス（米国特許第5,231,841号、本明細書中に参考として引用される）、サイトメガロウイルスなど）がMiller（Miller, 1992）に記載されるように用いられ得る。単純ヘルペスミジンキナーゼ（HSV-K）遺伝子は、レトロウイルスベクター系を用いて細胞膜に送達されている（そこで、遺伝子伝達ウイルス細胞シクロビルに対する感受性を破壊した）（Culverら, 1993）。

第二世代レトロウイルスベクターを用いた遺伝子送達もまた報告されている。Kassamら（1994）は、モノマウス白血病ウイルス（これは、通常マウス細胞のみを感染する）の操作された複製体を調整し、そしてこのウイルスが特異的にエリスロポエチン（EPO）レセプターを保有するヒト細胞に感染し、そして感染するようにエンベロープタンパク質を変更した。これは、EPO配列の一部をエンベロープタンパク質に挿入し、新たな融合特性を有するキメラタンパク質を作製することによって達成された。

上記のような送達系は、本発明と関連して用いられ得る。レトロウイルス複製

の等価物でないことがすでに説明されている。

しかし、本発明の状況において、変異または変更が、皮肉の完全な欠損を有す

るタンパク質を生じない限り、生じるタンパク質は、本発明の目的のために生物学的機能の等価物であると考えられることもまた想像される。実際、異なるタンパク質の特性を有するタンパク質を生じるアミノ酸置換は、本発明の範囲内にある。これは、発色領域外部および発色領域外部の置換を含む。

9. 部位特異的変異の検出

部位特異的変異の検出は、ヒト化gfp遺伝子のさらなる複製体を調製するために用いられ得る。部位特異的変異の検出は、基盤となるDNAの特定の変異を検出すること、種々のペプチド、または生物学的に機能するタンパク質もしくはペプチドの配列において有用な技術である。この技術は、1つ以上のヌクレオチド配列変異をDNAに導入することによって変異体を調製し、そして配列決定する準備ができた能力をさらに提供する。

部位特異的変異の検出は、所望の変異のDNA配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列、ならびに類似した欠失領域の両側に安定な二重鎖を形成するのに十分なサイズおよび配列類似性を有するプライマー配列を提供するために十分な数の単独ヌクレオチドの使用によって変異体の生成を可能にする。代表的には、変えられた配列の連続部分の両側に約5〜10塩基を有する約17〜25ヌクレオチド長のプライマーが好ましい。

部位特異的変異の検出は、種々の方法によって例示されているように（Millerら, 1993）、一般に当該分野で周知である。理解できるように、技術は、代表的には、一本鎖および二本鎖の形成の両方で存在するファージベクターを用いる。部位特異的変異の検出に有用な代表的なベクターは、M13ファージ（Messingら, 1991）のようなベクターを含む。これらのファージは、容易に市販されており、そしてそれらの使用は、当業者に一般に周知である。二本鎖プラスミドもまた、目的の遺伝子をプラスミドからファージへ移行する工程を排除した部位特異的変異の検出において日常的に利用される。

一般に、本明細書に従う部位特異的変異の検出は、まず一本鎖ベクターを得るこ

17

と、またはその配列内にgfpまたはヒト化gfpをコードするDNA配列を含む二本鎖ベクターの二本鎖を融合増幅することによって行われる。所望の変異配列を導

出するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般に合成的に、例えばCreas (1978)の方法によって調製される。次いで、このプライマーを一本鎖ベクターとアニーリングさせ、そして変異体有義の合成を完了するためにDNA重合酵素(例えば、E.coliポリメラーゼIII)を用いる。従って、ヘテロ二重鎖が形成され、ここで一方の鎖は、元の非変異配列をコードし、そして第二の鎖は、所望の変異を含有する。次いで、ヘテロ二重鎖ベクターを用いて、適切な断片(例えば、E.coli断片)を形成転写し、そして変異配列を含有する断片ベクターを含むコロニーをスクリーニングする。

適切な方法はまた、本明細書中で参考として引用される米国特許第5,888,288号に記載されている。

部位特異的変異誘発を導く選択されたヒト化gfp遺伝子の配列改変体の調製は、遺伝的に有用な変異を生産する手段として提供され、そして限定することを経験しない。なぜなら、gfpの配列改変が得られる他の方法が存在するからである。例えば、所望のヒト化gfp遺伝子をコードする断片ベクターは、変異原性の因子で処理され、配列改変体を得る。(ヒドロキシルアミンを用いるプラスミドDNAの変異誘発については、例えば、Eichental, 1979によって記載される方法を参照のこと)。

前述の方法は、変異誘発における簡便に適切であるが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の使用が、ここでは一般に好ましい。この技術は、所望の変異を所定のDNA配列中に導入するための迅速かつ効果的な方法を提供する。以下の文は、所定の配列によってコードされるアミノ酸を変更するために用いられ得るような、変異を配列中に導入するためのPCRの使用を特に記載する。本方法の適応はまた、DNA分子中に制限酵素部位を導入するためにも適切である。

この方法において、各オリゴヌクレオチドは、増幅されたセグメントの一端に点変異を組み込むように設計される。PCRに続き、増幅されたフラグメントは、クレンジングフラグメントで処理することによって平末端化され、次いで、こ

の平末端化されたフラグメントは、配列分析を容易にするためにベクター中に連結され、そしてサブクローニングされる。

変異誘発しようと所望するテンプレートDNAを調製するために、DNAを高コピー

数ベクター(例えば、pUC9)中に、変異される領域に挿入する制限部位を用いてサブクローニングする。次いで、テンプレートDNAをプラスミドミニプレップを用いて調製する。調製に基づくが、所望の点変異を含有、そして増幅で制限酵素部位が隣接する適切なオリゴヌクレオチドプライマーは、自動化合成機を用いて合成される。プライマーがテンプレートDNAに対して約15塩基対相対であることが、一般に必要とされる。プライマーは、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製されるが、これは、PCRにおける使用に絶対には必要ではない。次いで、オリゴヌクレオチドの5'末端がリン酸化される。

テンプレートDNAは、所望の点変異を含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRによって増幅される。増幅産物中の塩基の量は、一般に約15μmolである。一般に、約20-25サイクルのPCRが以下に行われる: 35°Cで35秒の変性; 54°Cで2分間のハイブリダイゼーション; そして72°Cで2分間の伸長。PCRは、一般に72°Cで約10分間の最終サイクルの伸長を含む。最後の伸長工程後、約5塩基のクレンジングフラグメントが反応混合物に添加され、そして約37°Cでさらに15分間インキュベートされる。クレンジングフラグメントのエキソヌクレアゼ活性は、平末端クローニングのために末端を平滑かつ適切にするために必要とされる。

得られる反応混合物は、増幅が予想された生産物を生じたことを確認するために、挿入性アガロースゲル電気泳動またはアクリルアミドゲル電気泳動によって一般に分析される。次いで、反応混合物を、塩浴のほとんどを除去し、クロロホルムで抽出して残りの油を除去し、乾燥化フェノールで抽出し、次いで100%エタノールで沈殿させることによって濃縮することによってプロセスする。次いで、増幅されたフラグメントの約半分を、オリゴヌクレオチドにおいて使用された制限酵素で切断する制限酵素で消化する。消化されたフラグメントを低グル化/塩基 (low salt/NaCl) アガロースゲル上で精製する。

フラグメントをサブクローニングし、そして変異体をチェックするために、2つの増幅フラグメントを、平末端化によって、適切に消化されたベクター中にサブクローニングする。これは、E.coliを形成転写するために用いられ、該いてこのE.coliから、プラスミドDNAがミニプレップを用いて調製される。次い

で、正確な点変異が生産されたことを確認するために、プラスミドDNAの増幅された部分は制限酵素決定によって分析される。Taq DNAポリメラーゼがさらなる変異をDNAフラグメントに導入し得るので、これは重要である。

点変異の導入はまた、制限酵素PCR工程を用いてもたらされる。この手順において、変異を包含する2つのフラグメントが互いにアニーリングされ、そして相互にプライムされた合成によって伸長される。次いで、このフラグメントは、第二のPCR工程によって増幅され、それにより上記のプロトコルが必要とされる平末端増幅を回避している。この方法において、テンプレートDNAの調製、オリゴヌクレオチドプライマーの合成、および第一のPCR増幅は、上記のように行われる。しかし、このプロセスにおいて、選択されたオリゴヌクレオチドは、テンプレートDNAに約15-約20塩基のストレッチについて相対であり、そしてまた約10塩基以上互いに重なりなければならない。

第二のPCR工程において、各増幅されたフラグメントおよび各制限酵素プライマーを用いて、そして約20-約25サイクルのPCRを、上記の条件を用いて行う。再び、フラグメントをサブクローニングし、そして点変異が正確であったことを完全に確認した工役を用いてチェックする。

以下の方法のいずれかの使用において、可能な限り小さなフラグメントを増幅することにより変異を導入することが一般に好ましい。もちろん、オリゴヌクレオチドの融解温度のようなパラメータはまた、一般に位置およびオリゴの長さにより影響されるため、注意深く考慮されるべきである。これらの方法の成功および必要な場合のこれらの最適化は、当業者に熟知であり、そして該々の文献(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, 1995 (本明細書中に参考として引用される))にさらに記載される。

18. 変異プラスミドおよびベクター

広範な種々の組織入プラスミドおよびベクターがヒト化gfp遺伝子を発現するために操作され、それにより細胞にgfpを迅速するために使用される。

本明細書中で使用される用語「発現ベクター」は、該配列が哺乳動物細胞またはヒト細胞において転写される、ヒト化gfp遺伝子の複製配列を含む任意の

タイプの遺伝子構築物を含む。本発明の発現ベクターはまた、本発明自体により提供されるように、gfpタンパク質への翻訳を促進する、ヒト化gfp配列に加えて、発現ベクターは一般に、通常の細胞および使用を容易にするためにベクターにおいて用いられる制限酵素切断部位および他の機能、終結および介入DNA配列を含む。

哺乳動物細胞において使用するための発現ベクターは、通常、複製起源(必要に応じて)および発現されるべき遺伝子の前に位置するプロモーターを含む。好ましくは、ポリAデニル化部位および翻訳開始配列が含まれる。リボソーム結合部位および5'UTRプライム部位がまた含まれる。例は、SV40複製原点185/195スプライスドナー/スプライスアクセプターシグナルである。

複製起源は、外因性因子を含むようなベクターの調製(例えば、SV40または他のウイルス(例えば、ポリオ、アデノ、HSV、PPV)供給源由来であり得る)により提供されるか、または宿主細胞染色体複製機構により提供される。ベクターが宿主細胞染色体に組み込まれる場合、整合がしばしば十分である。プロモーターは、以下に議論される。

特定の開始シグナルがまた、発現を制御するために必要とされる。これらのシグナルは、ATC開始コドンおよび開始配列を含む。ATC開始コドンを含む外因性翻訳開始シグナルは、さらに提供されることが必要とされる。当業者は、容易にこれを決定し得、そして必要なシグナルを容易に得る。開始コドンが、挿入される細胞の複製を決定するために、所望のコード配列のリーディングフレーム内でインフレーム(または、インフェーズ)でなければならぬことは周知である。これらの外因性翻訳開始シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の種々の経路であり得る。発現の効率は、適切な転写エレメントおよび転写ターミネーターを含むことにより増強される(Miller et al., 1987)。

18

遺伝子送達のために潜在的に良好なベクターであることを実証している。LaFaceら、1988; Zhouら、1993; Flotteら、1997; Walshら、1999。組織特異的ベクターは、マーカー遺伝子 (Kapitlinら、1994; Lebowitzら、1998; Samtskikhら、1998; ShellingおよびSmith、1994; Yoderら、1994; Zhouら、1994; BernmanおよびKuznetsovら、1994; Tratschlerら、1995; McLaughlinら、1998) およびヒト免疫系に感染する遺伝子 (Flotteら、1997; Laoら、1994; Ohiら、1990; Walshら、1997; Weilerら、1994) のインビトロおよびインビボ感染のために有用なベクターとして使用されている。最近、AAVベクターは遺伝性疾患の治療のための第1相ヒト試験のために認可されている。

AAVは、培養細胞において生体感染を行うために別のウイルス (アデノウイルスまたはヘルペスウイルスファミリーのメンバーのいずれか) との同時感染を必要とする。既存性パルボウイルスであるCherryoke、1992。ヘルペスウイルスとの同時感染の存在下では、野生型AAVゲノムはその末端を結してヒト第19染色体へ組み込み、ここでプロウイルスとして潜伏状態にある (Collinsら、1990; Samtskikhら、1998)。しかし、rAAVは、AAV Repタンパク質もまた発現されなければ、第19染色体への組み込みを制限されない (ShellingおよびSmith、1994)。AAVプロウイルスを有する細胞がヘルペスウイルスで感染された場合、AAVゲノムは染色体からまたは細胞プラスミドから (後者) され、そして正常な生体感染が成立される (Samtskikhら、1998; McLaughlinら、1998; Berns、1990; Kozlovら、1990; Kuznetsovら、1992)。AAVは、感染のために広範な宿主範囲を有する (Tratschlerら、1994; Laughlinら、1998; Lebowitzら、1998; McLaughlinら、1998)。

典型的には、組織特異的AAV (AAV) ウイルスは、2つのAAV末端反復配列に隣接する目的遺伝子を含むプラスミド (例えば、図2B、およびMcLaughlinら、1998; Samtskikhら、1998を参照のこと)。ならびに末端反復を有さない野生型AAVコード配列を含む複製プラスミド (例えば、図1B、およびSmithら、1991) を同時トランスフェクトすることにより作製される。細胞はまた、AAVヘルペス様体に必要なアデノウイルス遺伝子を有するアデノウイルスまたはプラスミドで感染もしくはトランスフェクトされる。このような形式で作製されたAAVウイルスストックは、

典型的にはアデノウイルスE1領域を有さない。従って、E1コード配列が除去されている位置にヒト化gfp遺伝子を導入するのが最も便利である。しかし、アデノウイルス配列中のヒト化遺伝子の挿入の位置は、重要ではない。ヒト化転写単位はまた、Karlssonら、(1998) により最初に記載されたように、E1領域ベクターにおける欠失されたE1領域のかわりに挿入される。

15. 発現キット

ヒト化gfp遺伝子を含む発現キットが、本発明の例の局面を形成する。このようなキットは一般に、適切な培養基において、ヒト化gfp遺伝子またはヒト化gfp遺伝子を発現し得るベクターの混合物を含む。遺伝子またはベクターは、通常的に受容可能な処方において提供される。

キットの成分が1つ以上の培養液において提供される場合、液体培養は本発明であり、細胞培養が特に好ましい。ヒト化gfp遺伝子またはベクターはまた、注入可能な組成物中に処方される。この場合、容器自体はシリンジ、ピペット、点滴器、または他のこのような器具であり得、これらから処方物が細胞、または身体のある領域に適用されるか、あるいは動物に注入されるか、あるいは適用されてキットの他の成分と混合される。

しかし、キットの成分は、乾燥粉末として提供される。試薬または成分が乾燥粉末として提供される場合、粉末は、適切な溶媒の添加により再懸濁される。溶媒が別の容器手段で提供されることもまた意図される。

容器手段は、一般的に少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリンジ、または他の容器手段を含む。この中にヒト化gfp遺伝子またはベクターが入れられ、好ましくは適切に配分される。第2のヒト化gfp遺伝子またはベクター組成物がまた提供される。ここでキットはまた一般に、それが入れられる第2のバイアルもしくは他の容器手段を含む。キットはまた、通常的に異なる可能な送達手段または他の送達手段を含むための第2/第3の容器手段を含む。

本発明のキットはまた、典型的に、例えば、所望のバイアルが保持される注入または吹き込み形成されたプラスチック容器のような、バイアルを市販のための

rAAV粒子から物理的に (例えば、塩化セシウム密度勾度分離により) 分離されなくてはならないアデノウイルスにより感染される。あるいは、AAVコード領域を含むアデノウイルスベクターまたはAAVコード領域を含む細胞膜およびいくつかは全てのアデノウイルスヘルペス遺伝子が使用される (Yangら、1994; Clarkら、1995)。組み立てられたプロウイルスとしてrAAV DNAを有する細胞性がまた使用される (Flotteら、1997)。

rAAVベクターは、米国特許第5,139,941号および第4,794,398号に記載され、各々は参照として本明細書中に援用される。

16. アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクター、および好ましくは複製欠損ベクターは、本発明の例において使用される。例えば、ウイルスが、細胞性ゲノムからアデノウイルス初期領域1遺伝子を発現する細胞 (例えば、ヒト293細胞) においてのみ複製コンピテントであるようなウイルス初期領域1 (E1) 領域の欠失により達成される。従って、ウイルスは初期遺伝子産物を発現しない正常細胞を感染しないので、これは重要である。複製欠損アデノウイルスを調製するための技術は、Kesh-ChoudhuryおよびGraham (1987); McGorrayら、(1988); ならびにClemensら、(1992) により例示されるように、当該分野で周知である。Rosenfeldら、(1991; 1992) およびIrrator-Ferricandolaら、(1990; 1992) はまたアデノウイルスの使用を記載する。

アデノウイルスベクターが複製欠損である必要条件以外には、アデノウイルスベクターの特性は重要ではないと考えられる。アデノウイルスは、43の異なる公知の血清型または亜型A-Dの任意のものであり得る。本発明の方法における使用のための条件付複製欠損アデノウイルスベクターを得るためには、亜型Cのアデノウイルス5型が好ましい出現物である。これは、アデノウイルス5型が、これについて大量の生化学的および遺伝的データが知られており、歴史的にアデノウイルスベクターとして用いるほとんどの場合に使用されており、そして非発ガン性のヒトアデノウイルスであるからである。

これらの局面における使用のためのベクターは複製欠損という点で、これらは

細胞複製に含むための手段を含む。

容器の腔または腔に隣接する。本発明のキットはまた、1つ以上のさらなる分子生物学的試薬 (例えば、調製試薬) を含むか、一緒にパックされる。

15. 組織感染

所望のクローンは、組織感染のためにヒト化gfpと発現系に取り込まれる。実質的に任意の真核生物発現系がこの形式において用いられると考えられる。宿主細胞の選択されたタンパク質およびヒト化gfpをコードするDNAセグメントで

の事実組織は、感染をモニターする便利な手段を提供する。宿主細胞が一般にタンパク質への翻訳のための機能的細胞を得るためにゲノム転写物をプロセスするので、cDNAおよびゲノム配列の両方が真核生物発現系に適合する。

概して言えば、組織感染として遺伝子のcDNAバージョンを用いるのがより便宜であり得る。cDNAバージョンの使用は、典型的にはcDNA遺伝子よりも1桁の単位でより大きいゲノム遺伝子よりも、遺伝子のサイズが一般にかなり小さく、そして簡便化細胞をトランスフェクトするために容易に用いられるという利点を提供すると考えられる。しかし、特定の遺伝子のゲノムバージョンが用いられる可能性は排除されない。

上記のように、異なる色のヒト化gfpを用いて、異なるタンパク質が同じ細胞において同時発現される。そしてモニターされることが望まれる。これは、2つの異なる組織感染ベクター (各々が特定のタンパク質コード領域に隣接したヒト化gfpのコピーを有する) で細胞を同時トランスフェクトすることにより達成される。あるいは、このようなコード領域の両方を含むように1つの組織感染ベクターが構築され、次いで1つのベクターでトランスフェクトされた細胞において発現される。

17. 組織感染手順

細胞「感染」および「組織感染」細胞は、ヒト化gfp遺伝子配列を含む外因性DNAセグメントまたは遺伝子が導入されている細胞ということが意図される。従って、操作細胞は、組織的に導入された外因性DNAセグメントまたは遺伝子を含む

20

ない天然に存在する細胞と区別される。従って、操作細胞は、人の手によって導入された遺伝子を有する細胞である。

培養において連続的に増殖する樹立された細胞株は、本発明の用途において使用される細胞の1群を形成する。特に使用のために意図されるこのような哺乳動物宿主細胞株の例は、VEE細胞、Hela細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株、COS-7のようなCOS細胞、F12、BHK、Pep-2、3T3、3T6、MDCK、A549、P12、K562、および3Y3細胞である。

初代細胞株はまた、本発明での使用のために意図される。初代細胞株は、動物

またはヒト細胞から取り出された細胞であり、そして制限された時間の飼育条件下において生存し得る。このような細胞はしばしば操作され (例えば、有益な遺伝子を導入するために)、次いで細胞が本発明された動物に導入される。この技術は、しばしばエクスピロ遺伝子転送といわれる。

全ての脊椎動物種の初代細胞が、動物の身体に戻されても戻されなくても、本発明の用途に使用されるヒト化gfp遺伝子での使用のために考慮される。これらは例示のために、骨髄細胞、神経細胞、肺上皮細胞および肝細胞を含む。

発現、分離または別の方法で治療または診断の目的で動物またはヒト動物体に送達するように事前に操作されている動物中のヒト化gfp含有細胞はまた、本発明の用途に使用されてもよい。本発明の用途に使用される。量論的な宿主動物からそのような得られない細胞は、免疫学的適合性動物からの細胞。免疫学的に改変または調整された細胞。宿主動物における遺伝子デバイス中に保持された細胞。および/または広範囲には、宿主動物中で一時的な生命を有するように意図される非改変細胞であり得る。

もちろん、本発明がより直接的な遺伝子療法における使用のためによく適応するように、本発明に記載されるような任意の動物の細胞がヒト化gfp遺伝子を含むことが理解される。このような細胞の全てが、本発明の用途に使用される「組織発生源細胞」の記載の範囲に入ると考慮される。これは、細胞が遺伝子を獲得する模式 (例えば、トランスフェクション、感染など) に関らず、ヒト化gfp遺伝子またはベクターの1つ以上のコピーを含む動物またはヒト動物体中

の任意の細胞を含む。疾患細胞、欠陥細胞および正常細胞が全てこの様式において本発明中に包含される。

18. 動物のgfp遺伝子のクローニング

動物の生物からのgfp遺伝子がクローニング化されることがまた意図される。これらは、改変されたまたはそうでなければ所望の生物の特性を有し得、次いで本発明に従ってヒト化され得る。

別の生物からのgfp遺伝子バンクをコードするRNA分子のクローニングは、単に、特異的RNA分子を、そしてRNAの断片から区別して検出するためにRNAライ

ブラリーをスクリーニングすることと必要とする。このようなクローニング手順の最初の工程は、適切なライブラリーのスクリーニングである。スクリーニング手順は、発現スクリーニングプロトコル (例えば、gfpタンパク質に対して指向された抗体を用いるか、または蛍光に基づく活性アッセイ) であり得る。

あるいは、スクリーニングは、公知のgfp RNA配列の部分を探知して送達されたオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションに基づき得る。このようなスクリーニングプロトコルの操作は当業者に周知であり、そして科学文献に詳細に記載される (例えば、Sambrookら、(1989) (本明細書中に参照として送達される))。

以下の実施例は、本発明の好ましい実施例の実質を含む。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施においてよく理解するとして本発明者に見出された既知の技術を、従って、この実施のために好ましい様式を構成すると考えられることが当業者に理解されるはずである。しかし、当業者は、本発明に開示されて、開示される特定の実施例において多くの変更がなされ得、そして本発明の精神および範囲から逸脱することなくなお同様のまたは類似の結果を得ることができると理解するはずである。

実施例1

293細胞におけるクラーゲン (gfp) の発現

本実施例は、293細胞におけるトランスフェクションおよび発現においてクラー

ゲン (gfp) レポーター遺伝子を発現する組織欠陥 (rAAV) を使用する試みを記載する。

野生型gfpを発現するAAVベクターおよびrAAVの産生

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、現在、異なる形態に遺伝子を送達するベクターとして広範囲に用いられている。AAVの使用には多くの利点がある。例えば、明白な病原性の存在、ビリオンの高生存度、宿主特異性の低さ、送達遺伝子の長寿性、ならびに宿主免疫系および細胞免疫への比較的な非侵襲性が挙げられる。

AAVの1つの欠点は、ウイルス粒子の限定されたパッケージサイズであり、これは5.000ヌクレオチドを超過し得ない。現在利用可能なほとんどのAAVベクターは、あるレポーター遺伝子または別のレポーター遺伝子、すなわちcoliphage-ガラクトシダーゼおよびネオマイシンホスホトランスフェラーゼを含有する。これらのレポーター遺伝子は両方とも非常に大きく、AAVゲノムの限られたスペースのあまりに多くを占有する。これらの遺伝子発現に対する検出プロトコルは、難しくかつ煩わしい。

本セクションは、組織欠陥AAVベクタープラスミド、pTetg-UF (図2A; これはクラーゲン (gfp) 遺伝子およびneoc遺伝子の両方を含有する) の調製を記載する。プラスミドpTetg5 (Hardy, 1994) をgfp遺伝子配列の供給源として用い、そしてこの遺伝子を即時複製プロモーターの制御下に配置した。ベクター産生の模式図を図2Bに示す。

最初に、プラスミドpTetg5 (Challinor, 1994) をNotIおよびEcoRIで消化し、Klenowフラグメントで末端を埋め、そしてNotIリンカーを添加した後に、gfp遺伝子をpCDB (Chen) のNotI部位にサブクローニングした。次いで、得られたプラスミド (pCDBgreen) とするテンプレートとして用いて、CDBプロモーター、SV40イントロン、gfp10 cDNAおよびSV40ポリAニル化シグナルを含有する転写カセットをPCR反応で増幅した。

CDBプロモーターに特異的なpTetgプライマーはまた、BgIII、EcoRIおよびCp

グナルに特異的である) は、SalI部位突出部を含んでいた。反応生成物 (NotI消化) のポリAニル化シグナルを、テンプレートとしてプラスミドpCDB (Challinor) を用いた別のPCR反応において増幅した。この反応における上流プライマーは、SalI部位突出部を含み、そして下流プライマーはBgIII部位を含んでいた。

1%アガロースゲルにおけるPCR産物の精製の後、それぞれのフラグメントを3'に消化し、そして制限されたSalI末端によって互いに連結させた。連結産物をゲル精製し、そしてBgIIIで消化した。pCDBgfp10-PstIフラグメント (AAV末端反復を含有する) を、プラスミドpTetg5 (Challinor, 1994) からゲル精製によ

って分離した。このフラグメントを、以前に消化されたプラスミドpTetg5 (Challinor, 1994) に由来するpTetg5 (II) にサブクローニングした。次いで、それをBgIII消化カセット (CDBプロモーター、SV40イントロン、gfp10 cDNA、SV40ポリA) およびPstIポリ (II) を含有する) の両末端に連結した。

次いで、連結産物をPstIで切断し、そしてプラスミドpTetg5 (II) (Stratagene) にサブクローニングした。これは、PstI-リンカーを挿入し、そしてポリリンカー領域を含有する内部3'UTRフラグメントを除去することによって76および1143のPstI部位をPstI部位に交換することにより改変されている。得られたプラスミドをpTetg5と命名した。

ポリオマウイルス由来のPstI-ミジミナーゼ遺伝子プロモーターおよびエンハンサーによって駆動されるneoc遺伝子カセットを、プラスミドpTetg5 (II) (Stratagene) をDraIで切断し、Klenowで末端を埋め、SalI リンカーを添加し、そしてSalIで消化することによってこのプラスミドから取得した。neocカセットを含有する3'UTRフラグメントをゲル精製し、SalIで消化したpTetg5 (II) のPstI部位にサブクローニングした。得られた構築物、pTetg5-UFを図2Bに示す。

組織欠陥 (AAV) ウイルスを産生するために、293細胞をpTetg5-UFおよびヘルパープラスミドpTetg5 (末端反復を有さない) AAVゲノムを含有する pCDB (Challinor, 1994) で同時トランスフェクトした。同じ細胞にまた、感染多量度 (i.o.d.) 10でアデノウイルスを感染させた。

組換えGFPアデノウイルスの構築および使用

この実施例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

アデノウイルスシャトルベクターpΔE1GFP (図2B) を構築するために、親プラスミドpIT1-GFP1で部分的に消化し、次いでpE1GFP1で完全に消化した。GFPプロモーター、イントロン、IRESエレメント、GFP1 cDNA、およびp3'UTR 5'からなる低分子量セットを、アガロースゲルから単離した。このフラグメントを、BamHIおよびSalIで消化したpΔE1GFP1 (Beitler, 1994) にサブクローニングした。

組換えアデノウイルスを構築するために、シャトルベクターpΔE1GFP (Beitler, 1994) およびΔE1ベクターpIT17 GRCrocyra, 1994) を、供給者 (Microbix Biosciences Inc.) によって提供される手順を使用して、293細胞に同時トランスフェクトした。組換えΔE1を含むブランクを、典型的な細胞毒性効果 (CPE) を示す鮮やかなグリーン細胞の群について、エッセンス (effluents) での視覚的選別によってスクリーニングした。組換えΔE1を、組換えGFPと各付け、そして標準的な技術を用いて増殖させた。

pΔE1GFPを、アデノウイルスゲノムpIT17 GRCrocyra, 1994) の型を含有するプラスミドとインピンズで組換えする場合、GFPを有し、そしてそれを発現する組換えアデノウイルスが生成された (図8)。GFPレポーター遺伝子は、組換えΔE1ブランクの容易な選別を可能にした。蛍光顕微鏡によって調べた場合、周の組換えブランクは、典型的なアデノウイルスCPEを示す鮮やかなグリーン細胞の密集した (concentrated) 群から単離されたが、偽りの組換えブランクは、グリーン細胞を含まなかった。真のブランクに対する偽りのブランクの比は、pΔE1GFPシャトルプラスミドとpIT17ドナープラスミドとの混合比率を使用する場合、約1:2であった。従って、GFP選択の使用は、スクリーニングプロセスを有意に単純化した。

実施例2

モルモットの光レセプター-細胞の構築

この実施例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

実施例2

モルモットの光レセプター-細胞の構築

この実施例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

実施例2

モルモットの光レセプター-細胞の構築

この実施例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、ヒト化、pEGFP2、pEGFP2の構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、ヒト化、pEGFP2、pEGFP2の構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、ヒト化、pEGFP2、pEGFP2の構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、ヒト化、pEGFP2、pEGFP2の構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、ヒト化、pEGFP2、pEGFP2の構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、ヒト化、pEGFP2、pEGFP2の構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、ヒト化、pEGFP2、pEGFP2の構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

この実施例は、ヒト化、pEGFP2、pEGFP2の構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

参考文献

この実施例は、ヒト化、pEGFP2、pEGFP2の構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2遺伝子における異なるベクター系の使用を示す。

- Adams et al., "Vectors for using given fluorescent proteins (gfp) as a reporter of gene expression and protein localization in mammalian cells", *FASEB J*, 9(5):A1336, Abstract 8425, 1995.
- Adams et al., *in: Fluorescent Protein for Biological Activity of Living Cells: A Practical Guide*, ed. Mason, Academic, New York, pp. 133-149, 1993.
- Adams et al., *Nature (London)*, 348:694-697, 1991.
- Adelman et al., *DMJ*, 2:183, 1983.
- Balch et al., "Vectors for gene transfer derived from animal RNA viruses: Transient and stable expression of transduced genes," in: Kachadourian R, ed. *Gene transfer*. New York: Plenum Press, pp. 117-143, 1986.
- Barnett, J., J. Wilson, D. Sun, R. Forster, and J. Miquel, "Adenovirus Vector-Mediated *in vivo* Gene Transfer into Adult Murine Retina," *Invent. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35:2335-2342, 1994.
- Bennett, J.L. and R.D. Hall, "Codon Selection in Yeast," *The Journal of Biological Chemistry*, 257(5):3036-3037, March, 1982.
- Boh, A.J., W. Hadden, L. Prewett, and P.L. Graham, "An Efficient and Flexible System for Construction of Adenovirus Vectors with Insertions or Deletions in Early Regions 1 and 3," *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:8960-8966, 1994.
- Bittner et al., *Methods in Enzymology*, 153:16-54, 1983.
- Challa, M., T. Fu, G. Eickbush, W.W. Ward, and D.C. Pridmore, "Oncogene Fluorescent Protein as a Marker For Gene Expression," *Science*, 263:802-805, 1994.
- Chang et al., "Foreign gene delivery and expression in hepatocytes using a hepatitis B virus vector," *Hepatology*, 14:134A, 1991.

Chen, A.K., M.D. Horgan, W.W. Harnsforth, and E.I. Benay, "In: Integration of the Adeno-Associated Virus Genome into Cellular DNA in Latently Infected Human Dendritic Cells," *J. Virol.*, 33:739-743, 1983.

Clark, K.E., T. Varghese, D.M. Prater, and P.E. Johnson, 1993. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Human Gene Therapy* 6:1229-1241.

Cody, C.W., D.C. Pridmore, W.M. Ward, P.G. Pringle, and W.W. Ward, "Chemical Structure of the Hexameric Chromophore of The Aquaporin Gene-Fluorescent Protein," *Biochemistry*, 32:1212-1218, 1993.

Cohen, " Naked DNA Polysome Way to Vaccines," *Science*, 259:1691-1692, 1992.

Collier-Chapman et al., *J. Mol. Biol.*, 158:1, 1981.

Cougar et al., "A general method for the construction of recombinant vaccinia virus expressing multiple foreign genes," *Gene*, 88:1-10, 1989.

Cox et al., *J. Virol.* 67(9):2664-2667, 1993.

Cox et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:5763, 1976.

Culver, K.W., E. Fox, Z. Werbinger, S. Ishii, H. Ohtsuka, E.H. and Brown, R.M. In *in vivo* gene transfer with attenuated virus-producers cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 254: 1528-1532, 1992.

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, chapter 8, 1993.

Cutler and Ward, 1993.

Delegrave and Yeaman, "Screening sequences open to engineer proteins: Experimental results using yeast," *BioTechnology*, 11:1548-1552, 1993.

Delegrave et al., "Recursive assembly strategies," *Protein Engineering*, 6:327-331, 1993.

Delegrave et al., "Red-Shifted Excitation Maxima of the Green Fluorescent Protein," *BioTechnology*, 13:151-154, February, 1995.

Dick, W., M. Wirth, and H. Hensen, "Eukaryotic Transcription Units for Gene Expression in Mammalian Cells," *Gene*, 122:347-349, 1993.

Drysdale and Hargrave, *Fluorescent Protein and Applications Meeting*, Palo Alto, California (Alameda), 1994.

- Drig et al., *FEBS Lett.*, 367:163-166, 1995.
- Eickbush, *J. Bacteriol.*, 138:539-555, 1979.
- Finn, T.R., R. Bolow, R. Owens, R.A. Adams, R.A. Zeffin, P.L., and Carter, B.J. 1992. Gene expression from adenovirus associated virus vector in primary epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7:249-256.
- Flores, T.R., Adams, R.A., Conrad, C., McGuffee, R.A., Bolow, R., Ota, R., Zeffin, P.L., Gagliardi, W.B., and Carter, B.J. 1993. Stable *in vivo* expression of the cyclic adenosine monophosphate response element with an adenovirus-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10613-10617.
- Flores, T.R., Adams, R.A., and Zeffin, P.L. 1994. Adenovirus-associated virus vector gene expression occurs in postmitotic cells in the absence of reverse DNA integration. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11:517-521.
- Flores, T.R., Duncan-Oltra, X., Bolow, R., Adams, R.A., Carter, B.J., and Gagliardi, W. B. 1993. An improved system for packaging recombinant adenovirus-associated virus vectors capable of *in vivo* transduction. *Gene Therapy* 2, 29-37.
- Frederick et al., *Journal of Biological Chemistry*, 268:2254, 1993.
- Frye et al., "DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations," *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:11478-11482, 1993.
- Gil et al., *Lab. Invest.*, 68(1):12, 1991.
- Gilch-Chester and Graham, *Molecular Biology. Rev. Comm.*, 142:944-973, 1987.
- Ginsman et al., *in: Eukaryotic Viral Vectors* (Ginsman, Y., ed) pp. 187-192, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- Graham and Trower, "An algorithmically optimized combinatorial library screened by digital imaging spectroscopy," *BioTechnology*, 10:1357-1361, 1992.
- Grope, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and construction of suspension cell cultures," *Mol. Cell Biol.* 13:188-199, 1993.
- Graham and Van der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA," *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graham et al., "Codon Coding Usage and the Oncogene Hypothesis," *Nucleic Acids Research*, 8(1):49-62, 1980.

Graham, R., C. Gantier, M. Gony, M. Ambrose, and R. Mercler, "Codon Coding Usage is a Oncogene Strategy Modulated for Gene Expressibility," *Nucleic Acids Research*, 9(1):43-49, 1981.

Hahn, R., A.B. Oltelt, and R.Y. Taha, "Improved gene fluorescence," *Nature*, 373:602-604, February, 1995.

Hahn, R., A.B. Oltelt, and R.Y. Taha, "Wavelength Modulation and Posttranslational Autocleavage of Green Fluorescent Protein," *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:12301-12304, 1994.

Hartman, P.L., and Miquel, N. 1984. Use of adenovirus-associated virus as a transposon DNA cloning vector; transfection of noncyclo nucleoside into mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6464-6470.

Herscher et al., "Synthesis of hepatitis virus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HBeS cells," *J. Virol.*, 64:643-650, 1990.

Henson, T., "Correlation Between the Abundance of Escherichia coli Transfer RNAs and the Occurrence of the Responsive Codons in Its Protein Genes," *J. Mol. Biol.*, 144:1-28, 1980.

Henson, T., "Correlation Between the Abundance of Escherichia coli Transfer RNAs and the Occurrence of the Responsive Codons in Its Protein Genes: A Proposal for a Synonymous Codon Choice that is Optimal for the E. coli Translational System," *J. Mol. Biol.*, 151:389-400, 1981.

Henson, T., "Correlation Between the Abundance of Yeast Transfer RNAs and the Occurrence of the Responsive Codons in Protein Genes. Differences in Synonymous Codon Choice Patterns of Yeast and Escherichia coli with reference to the Abundance of Recognizing Transfer RNAs," *J. Mol. Biol.*, 158:577-597, 1982.

Henson, T., "The Frequency of Codon Usage in E. coli Genes: Correlation With Abundance of Cognate tRNA," p. 525-534, in: S. Omer et al. (ed.), "Genetic and Evolution of tRNA Polymers, tRNA, and Ribosomes," University of Tokyo Press, Tokyo and Harlow/North Holland, Amsterdam, 1980.

Inouye and Tani, *FEBS Lett.*, 341:227-230, 1994.

Jackson, R.L., M.T. Howard, and A. Kaminski, "The Novel Mechanism of Inhibition of Fluorescent RNA Transcription," *Trans. Fluoresc. Sci.*, 15:777-783, 1990.

Jung, E.K., N.G. Kuvshinov, M.J. Melillo, G.M. Doherty, A.C. Petruschewski, and E. Wimmer, "A Segment of The 5' Nontranslated Region of

26

- Encephalomyocarditis Virus RNA Directs Internal Entry of Ribosomes During *In Vivo* Translation," *J. Virol.*, 62:2436-2443, 1988.
- Rao *et al.*, "Triton X-100-Induced Membrane Fusion and Excretion in Rat Brain Tissue," *BIOTECHNIQUES*, 11:492-502, 1991.
- Rapin, M.J., Leary, P., Samadpour, R.I., Sun, X., Palf, D.W., O'Grady, K.L., and Dunning, M.J. 1994. Long-term gene expression and phenotypic correction using adenovirus-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature Genetics* 8:144-154.
- Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2383, 1986.
- Karlsson *et al.*, *Science*, 256:1373-1376, 1991.
- Koch, R.M., Stancovski, M., Samadpour, R.I., Zhu, Z., Hunter, C.A., McLaughlin, E., Margulies, M., and Bressan, R.I. 1990. Site-specific integration by adenovirus-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2211-2215.
- Korok, M., "At Least Six Nucleotides Precede the AUG Initiator Codon Enhance Translation in Mammalian Cells," *J. Mol. Biol.*, 194:977-989, 1987.
- Korok, M., "Downstream Secondary Structure Facilitates Recognition of Initiator Codon by Eukaryotic Ribosomes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:5393-5395, 1990.
- LaPine, D., Brummet, P., Whitehead, R., and Park, A. 1982. Gene transfer into hematopoietic progenitor cells mediated by an adenovirus-associated virus vector. *Virology*, 112:483-484.
- Laughlin, C.A., C.R. Castellino, and H.C. Chen, "Least Infection of KB Cells with Adenovirus-Associated Virus Type 2," *J. Virol.*, 68:515-524, 1994.
- Likhtov, L.R., McElroy, M.M., Chomaz, T.H., and Leach, L.R. 1983. Adenovirus-associated virus: a vector system for efficient introduction and integration of DNA into a variety of mammalian cell types. *Mol. Cell. Biol.* 3:3983-3994.
- Lodish, H. (1987). *J. Neurosci.* 13, 1.
- Li, T., M. Adelman, R. J. Bock, R. L. Bressan, T. E. Dyer, R. J. Bressan, and R. L. Bressan, "An *In Vivo* Transfer of a Reporter Gene to the Brain Mediated by an Adenoviral Vector," *Anest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33:2343-2348, 1994.
- Liu *et al.*, *J. Biochem. (Tokyo)*, 118:13-17, 1993.
- Lovoy *et al.*, *CRC*, 22:817, 1993.
- Loth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:1577, 1981.
- Oh, S., Bink, M., Tilley, M.K., and Ploek, S.G. 1994. Construction and replication of an adenovirus-associated virus expression vector that encodes human β -globin cDNA. *Gene*, 157:279-282.
- Pollard and Rosenberg, "Internal Initiation of translation of embryonic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA," *Nature*, 304:320-323, 1986.
- Powers *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:7713-7716, 1988.
- Pines, "GFP in *Dictyostelium*," *TRE*, 14(9):326-327, August, 1993.
- Powers *et al.*, "Enhancer-dependent expression of human β -globin genes introduced into mouse pro-B lymphocytes by electroporation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7161-7165, 1994.
- Prober, D.C., V.K. Eckhardt, W.W. Ward, F.J. Pendergast, and M.J. Conner, "Primary Structure of the Adenovirus Vector Gene-Fluorescent Protein," *Gene*, 111:229-233, 1992.
- Ridgway, "Microinjection expression vectors," *Ar. Rodriguez, R.L., Dambach, H.T., ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Second edition.* pp. 467-492, 1993.
- Rippe *et al.*, "Tissue-specific gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture," *Mol. Cell. Biol.*, 10:489-492, 1990.
- Witzke *et al.*, "Chimeric gene-fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells," *Current Biology*, 5(9):615-642, 1994.
- Rosenfeld, M.A., Shephard, W., Yoshizawa, K., Yonemura, K., Polyanova, M., Siles, L. S., Patten, R. K., Gilson, P., Stathakis-Parkeas, L. D., Parkeas, M., Siles, R., Patten, A., Lopez, J. P., and Crystal, R. G. *Science*, 252:631-634, 1994.
- Rosenfeld, M.A., Yoshizawa, K., Tagami, B. C., Yonemura, K., Stathakis, E. R., Delamater, W., Polyanova, M., Siles, L. S., Stathakis-Parkeas, L. D., Parkeas, M., Ogihara, W. T., Patten, A., Lopez, J. P., and Crystal, R. G. *Cell*, 68:143-153, 1992.
- Ryan *et al.*, "Sequence Requirements For Binding of Rep68 to the Adeno-Associated Virus Terminal Repeats," *J. Virol.*, 1991.
- Lee, F., Zhou, S.T., Chopra, R., Munch, N.C., Sowell, R.S., Benveniste, H.E., and Schreiber, A. 1994. Adeno-associated virus 2 mediated transfer and functional expression of a gene encoding the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 82 suppl. 1:303A.
- Margalit, D.G. and P. Sarnow, "Internal Initiation of Translation Mediated by the 5' Leader of a Cellular mRNA [see comments]," *Nature*, 353:94-96, 1991.
- McCurry, D.M., M. Christensen, and N. Margulies, "Sequences Required for Coordinate Initiation of Adeno-Associated Virus p19 and p40 Promoters by Rep Protein," *J. Virol.*, 65:2395-2405, 1991.
- McCurry, W.J., D.S. Benbow, and F.L. Ombres, "A Simple Technique for the Rescue of Early Region 1 Mutations into Infectious Human Adenovirus Type 5," *Phytophys.*, 163:414-417, 1992.
- McLaughlin, R.K., P. Collins, P.L. Brummet, and N. Margulies, "Adeno-Associated Virus Origin Transcription Vector: Analysis of Protein Structures," *J. Virol.*, 62:1963-1973, 1988.
- Murphy *et al.*, Third Cleveland Symposium on Microsatellites and Recombinant DNA, Editor A. Wilson, Clarendon, American, 1992.
- Miller 1992, *Can. Top. Microbiol. Immunol.*, 138:1.
- Morla, J.O. and J.W. Hastings, "Theory Transfer to a Microsatellite System," *J. Cell Physiol.*, 77:313-318, 1971.
- Morla *et al.*, *Electron Microscopy*, 12:2056-2061, 1974.
- Mullins *et al.*, *Nature*, 379:82, 1992.
- Mulligan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072, 1981.
- Margulies, M., "Use of Adeno-Associated Virus as a General Transduction Vector for Mammalian Cells," *Can. Top. Microbiol. Immunol.*, 133:97-123, 1992.
- Margulies, M. 1991. Use of AAV as a general transduction vector for mammalian cells. *Can. Top. Microbiol. Immunol.*, 133:97-123. (N. Margulies, ed., vol. 133, pp. 97-123. Springer Verlag, Berlin).
- Nicola, C. *et al.* (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1003.
- Nicola and Stein, "Liposome-mediated DNA transfer to embryonic cells," *Science*, 221:1185-1190, 1982.
- Sambrook *et al.* (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook, R.J., L.S. Chang, and T. Shindt, "Highly Pure Stocks of Recombinant Adeno-Associated Virus: Normal Integration Does Not Require Viral Gene Expression," *J. Virol.*, 63:3223-3228, 1989.
- Sambrook, R.J., Bressan, R.I., Tan, M., and N. Margulies, (1992) Cloning of AAV into pS1222: Rescue of latent virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2077-2081.
- Sambrook, R.J., Chang, L.S., and Shindt, T. 1993. High-purity stocks of recombinant adeno-associated viruses: Normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* 67:3223-3228.
- Sambrook, R.J., Fan, X., Miller, Z., Bock, L.D., Hageman, D.M., Hagedorn, M., and Hagedorn, L.A. 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosomes 19 and 20. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3941-3945.
- Stathakis *et al.*, *Gene*, 103:47, 1994.
- Shilling, A.M., and Smith, M.O. 1994. Targeted integration of truncated and internal adeno-associated virus vectors containing the neomycin resistance gene. *Gene Therapy*, 1:365-369.
- Stathakis, G., "Structure of the Chromosome of the Adenovirus Gene-Fluorescent Protein," *FEBS Lett.*, 194:229-232, 1995.
- Shimada and Bock, *Methods Enzymol.*, 194:303-312, 1991.
- Snyder, R.O., D.S. Ben, T. H., X. Xie, R.I. Samadpour, and N. Margulies, "Features of The Adeno-Associated Virus Origin Involved in Substrate Recognition by the Viral Rep Protein," *J. Virol.*, 67:6294-6304, 1993.
- Stewart *et al.*, 1990, *Hum. Gene Ther.* 1:263.
- Stathakis-Parkeas, L. D., Lopez, M., Chomaz, J. P., Parkeas, M., and Brind, P. *Hum. Gene Ther.*, 1:241-253, 1990.
- Stathakis-Parkeas, L. D., Mohai, I., Parkeas, M., and Brind, P. *J. Clin. Invest.*, 90:426-430, 1992.
- Stratton *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 3:221, 1992.
- Surgen and Ward, *Photochem. Photobiol.*, 45:626, 1985.

Sybakula et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:2024, 1962.

Tang et al., *Nature*, 336:152-154, 1992.

Thomson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:659-663, 1984.

Toribara et al., 1992, *Parish* 1: 623716

Tsuda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:559-563, 1984. A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eukaryotic vector: transient expression and encapsidation of the gene for the cytoplasmic protein myristicase. *Mol. Cell Biol.* 4:2073-2081.

Tsuda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:559-563, 1984. Adeno-associated virus vector for high-efficiency integration, expression and rescue of genes in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 5:1231-1239.

Tur-Kaya et al., "Use of electroporation in transducing biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes," *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

Ullmer et al., "Phage-like Protein Coat Assembled by Injection of DNA Encoded in a Viral Particle," *Science*, 259:1743-1745, 1992.

Wada, Y., S. Aoki, K. Tsuchiya, Y. Ishikawa, T. Ogihara, and T. Ikemura, "Codon Usage Table from the GenBank/Genbank Sequence Data," *Nucleic Acids Research*, 19(1991):5051-5061, 1991.

Wada, C.R., Minkels, A.W., Susskind, R.J., Brown, M.O., Miller, J.L., Young, M.B., and L.H., 1994. Phenotypic correction of Fanconi anemia in human hematopoietic cells with a recombinant adeno-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7271-7275.

Wada, C.R., Minkels, A.W., Susskind, R.J., Brown, M.O., Miller, J.L., Young, M.B., and L.H., 1994. Phenotypic correction of Fanconi anemia in human hematopoietic cells with a recombinant adeno-associated virus vector. *J. Clin. Invest.*, 94:1448-1452.

Wang et al., *Stem Cells*, 11:104-108, 1993.

Wang and Hwang, *Nature*, 369:600-603, 1994.

Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:4135-4139, 1993.

Ward and Schuman, *Biotechnology*, 11:453-454, 1992.

Ward, W.W., C.W. Cady, R.C. Hart, and M.J. Connor, "Adeno-Associated Virus DNA Replication in vivo: Activation by a Mitochondrial Protein/Rep 63 Protein," *J. Virol.*, 68:6029-6037, 1994.

Ward et al., "Spectrophotometric Analysis of the Energy-Transfer Chromophores in Rods and Cones of the Human Visual System," *Photochem. Photobiol.*, 31:611-615, 1980.

Ward et al., *Photochem. Photobiol.*, 31:603-608, 1982.

Ward, Jr., *Electrochromism and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications* (DeLoe and McSherry, eds.), Academic Press, pp. 235-252, 1981.

Wei, J.Y., Wei, P.-S., Susskind, R.J., and Schuman, J.A. 1994. Expression of the human glucosyltransferase and myelin basic protein genes in murine and patient primary fibroblasts transfected by an adeno-associated virus vector. *Gene Ther.* 1:267-274.

Yang, Q., Chen, F.Y., Tjeng, J.P. 1994. Characterization of cell lines that inducibly express the adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* 68:4843-4854.

Yoder, M.C., Kang, L.Y., Zhou, B.Z., Liu, F., and Schuman, J.A. 1994. In vivo gene transfer in murine hematopoietic stem cells mediated by the adeno-associated virus 2-based vectors. *Blood*, 82(suppl. 1):247A.

Witch, *Scientific American*, p. 56, May, 1993.

Whitney et al., *J. Biol. Chem.*, 267:1592-1595, 1992.

Wright et al., *Cell*, 11:221, 1977.

Wright et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2567, 1980.

Wu, J.A., Wilson, R.W., Williams, P., Cheng, W., Arnold, G., Juel, A., and Palgrave, P.L. (1994) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 267:1445-1448.

Yasuda, "Imaging sequence space," *Nature*, 369:79-81, 1994.

Yasuda et al., "Digital imaging spectroscopy for the study of parallel scattering of neutrons," *Applied to Engineering*, 346:773-781, 1993.

Zhou, S.Z., Schuman, J.A., Cooper, S., Hwang, M.A., and Schuman, J.A. 1993. Adeno-associated virus 2 mediated gene transfer in murine hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* (NY), 21:928-933.

1000

特許2000-503538

Zhou, S.Z., Cooper, S., Kang, L.Y., Ruggieri, L., Schuman, J.A., and Schuman, J.A. 1994. Adeno-associated virus 2-mediated high efficiency gene transfer into hematopoietic and murine muscle of hematopoietic progenitor cells in murine and human cells. *J. Exp. Med.*, 179:1857-1873.

Zou, et al., 1990, *Science* 249:209-211.

記号表

(I) 一般的情報:

(1) 出願人:

- (A) 名称: ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ ファウンデーション、インコーポレイテッド
- (B) 名称: グリッパード ホール 223
- (C) 市: ゲインズビル
- (D) 州: フロリダ
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号: 32611
- (G) 電話:
- (H) テレファックス:

(II) 発明の名称: ヒト化グリーン蛍光タンパク遺伝子および方法

(III) 記号表: 1.4

(IV) コンピューター読み出し形態:

- (A) 媒体: フロッピー ディスク
- (B) コンピューター: IBM PC 互換用
- (C) OS: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: パシフィック リリース 11.0, バージョン 11.0200

(V) 現在の出願データ:

- (A) 出願番号: 未知

(VI) 発明データ:

- (A) 出願番号: 05 00/228, 191
- (B) 出願日: 1990年1月18日

1000

特許2000-503538

(VII) 記号表 1 の説明:

(1) 記号の定義:

- (A) 長さ: 777 塩基対
- (B) 型: 複製
- (C) 塩の数: 一水素
- (D) トポロジー: 直線状

(2) 記号表 1 の説明:

AGCTGAGG GCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 60
GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 120
AGCTGAGG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 180
GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 240
GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 300
AGCTGAGG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 360
AGCTGAGG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 420
TTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 480
AGCTGAGG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 540
GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 600
GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 660
GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG GTCGAGGAG 720

(3) 記号表 2 の説明:

(1) 記号の定義:

- (A) 長さ: 1000 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 塩の数:
- (D) トポロジー: 直線状

(2) 記号表 2 の説明:

(A) 複製を有する記号: 0x01100-0110
(B) 存在位置: 60
(C) その他の情報: /座標+ "その他"
(D) "Res" または "Res"

(3) 記号表 3 の説明:

(A) 複製を有する記号: 0x01100-0110
(B) 存在位置: 60
(C) その他の情報: /座標+ "その他"
(D) "Res" または "Res"

ATGACGACG	CGGAGGAGCT	GGGATGAGG	GTGGGACCA	TGCTGCTGG	ACTGAGAGCG	58
ATGCTTACG	GGACAGAGT	TGCGGCGAC	CGAGGAGGG	AGGCTGCGG	CGACAGACCA	128
AGCTGCTCG	GGATGATCG	CGGCGGCTG	GGAGAGCGT	CGGCGGCGG	CGGACGACCG	140
GGACGACCT	TGCTGTAAG	CGGCGGCGC	TGTTGCGAG	ACCGACACCA	TGAGGACGCG	200
CGGCTCTTT	TGAGAGCGC	CGGCGCGCG	GGCTGCGGC	AGGAGAGAG	CGGCTCTTC	300
AGAGGTGCG	CGACACGCA	GACCGCGCT	GGATGCGG	TGAGAGGCG	CGGCTCTGCG	340
AGGAGGATG	AGTGGAGCG	CGGCTCTCT	AGGAGAGCG	GGAGCGCTT	CGGCGCGCG	420
CGGAGAGCG	AGGAGAGCG	CGGCGGCTG	TGCGGCGCG	CGGCGCGCG	AGGAGAGCG	500
AGGAGAGCG	ACTGAGAGG	CGGCGCGCG	AGTGGAGCG	GGCGCGCGG	CGGCGCGCG	540
CGGAGAGCG	GGAGAGCGG	GGGCGCGCG	TGCGCGCGG	CGGCGCGCG	CGGCGCGCG	600
CGGCGCGCG	AGGCGCGCG	CGGCGCGCG	CGGCGCGCG	CGGCGCGCG	CGGCGCGCG	660
CGGCGCGCG	AGGCGCGCG	CGGCGCGCG	CGGCGCGCG	CGGCGCGCG	CGGCGCGCG	720

② トロロジュー：産銀坑

電話2002-145533

(1) 配界の特徴：
 (A) 長さ：64 連番対
 (B) 型：狭度
 (C) 風の歌：一本調
 (D) トボロフ：直線状

(2) 配界：配界番号 11：

29

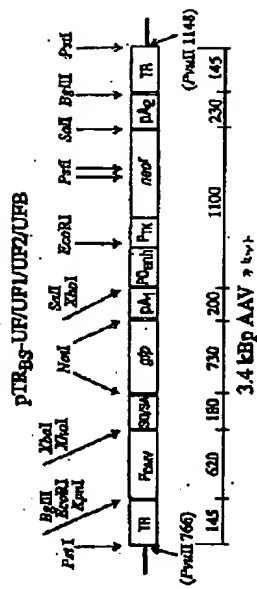


FIG. 28-1

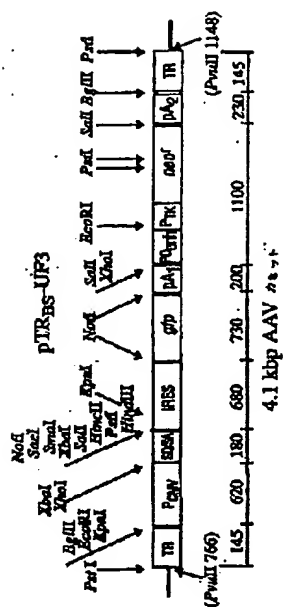


FIG. 2B-2

32

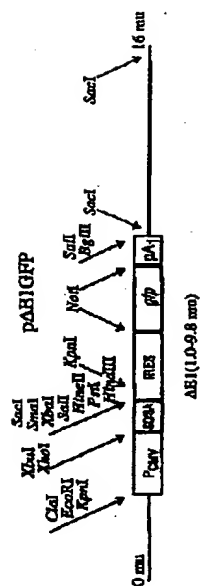


FIG. 28-3

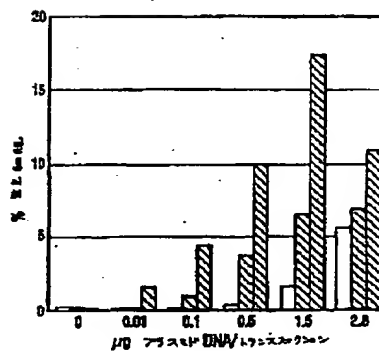


FIG. 3

[14]

FIG. 4A

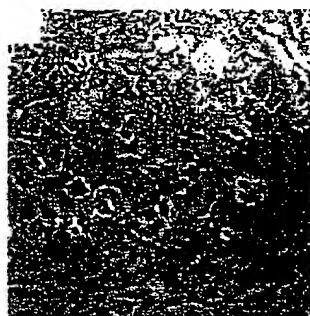


FIG. 4B



[15]

FIG. 5A

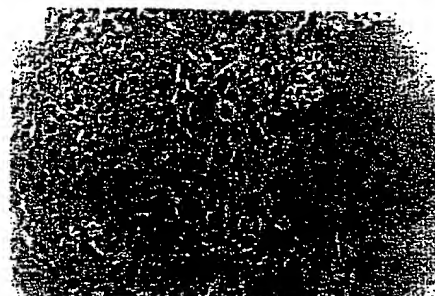


FIG. 5B



[16]

FIG. 5C



FIG. 5D



[17]

FIG. 6B

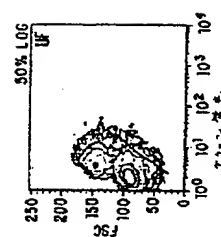
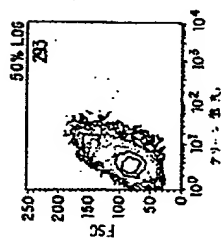


FIG. 6A



(146)

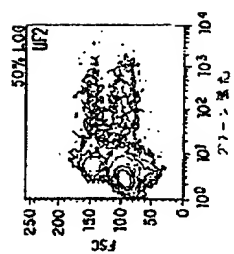


FIG. 6D

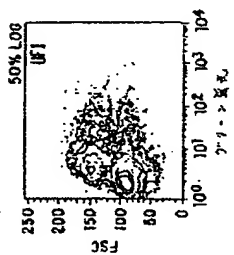


FIG. 6C

(147)

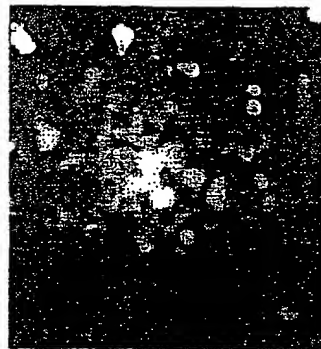


FIG. 7

(148)

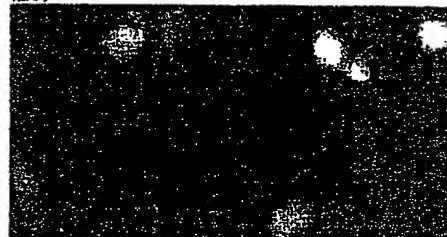


FIG. 8

(149)

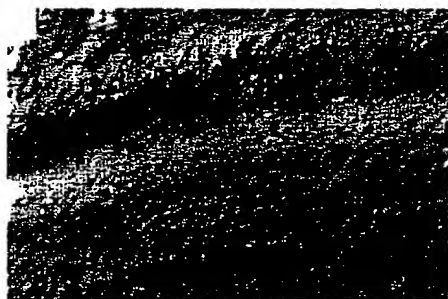


FIG. 9A



FIG. 9B

(150)



FIG. 9C



FIG. 9D

2  364

Number = [AY004213]

LOCUS AY004213 954 bp DNA linear SYN 28-JUL-2000
DEFINITION Synthetic construct luciferase (cluc) gene, complete cds.
ACCESSION AY004213
VERSION AY004213.1
KEYWORDS
SOURCE Renilla reniformis
ORGANISM synthetic construct
artificial sequences.
REFERENCE 1 (bases 1 to 954)
AUTHORS Ferbitz, L., Deininger, W., Fuhrmann, M. and Hegemann, P.
TITLE A synthetic gene coding for Renilla luciferase is a versatile
expression marker in green algae
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 954)
AUTHORS Ferbitz, L., Deininger, W., Fuhrmann, M. and Hegemann, P.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (04-JUL-2000) Institut fuer Biochemie, Universitaet
Regensburg, Universitaetstr. 31, Regensburg 93040, Germany
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..954
/organism="synthetic construct"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:32630"
/focus
source 11..946
/organism="Renilla reniformis"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:6136"
gene 11..946
/gene="cluc"
CDS 11..946
/gene="cluc"
/EC_number="1.13.12.5"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="luciferase"
/protein_id="AAF93188.1"
/db_xref="GI:9739244"
/translation="MASKVYDFEQRKRMITGPQTHARCKQNNVLDSEFINYYDSEKHAE
NAVIFLHGNAASSYLNRHVPHIEPVARCIIPDLIGNGKSGKSGNGSYRLLDHYKYL
ANFELLNLPKKIIIFVGHIDWACLAFFHYSYENQKIKAIIVHAESYVDVIESNDENPDIE
EDIALIKSEEGEKVLENNFFVETMLPSKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLS
WPREIPLVKGKGPVVOIVRNYNAYLRASDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPWT
EFVKVGLHFSQEDAPDEGKYIKSFVERVLKNDT"
BASE COUNT 217 a 298 c 298 g 141 t
ORIGIN
1 gatactcgag atggccagca aggtgtacga ccccgagcag cgcagcgca tgatcacgg
61 ccttcagtgg tggctcgcct gcaagcagat gaacgtgctg gacagottca tcaactacta
121 cgacagcgag aagcacgccg ageaacgcgt gatcttcttg caccgcaacg ccgccagcag
181 ctacctgtgg cgccacgtgg tgccccacat cgagcccggt gcccgctgca tcatcccca
241 cctgatcgcc atgggcaaga gcggcaagag cgcacacggo agctaagccc tgctggacca
301 ctacaagtac ctgaccgcct gtttcagctg gctgaacctg cccaagaaga tcatcttctg
361 ggcccaagaa tggcgccctt ccttgccctt ccactacaga tacgagcccc aggaacagat
421 caagcccatc gtccacgccg agagcgtggt gacgtgato gagagctggg acgagtgccc
481 cgacatcgag gaggacatcg cctgatcaa gacgaggag ggcgagaaga tggctgctga
541 gaacacatc ttctggaga caatgctgcc cagcaagatc atgcgcaago tggagccaga
601 ggagttcgcc gctacctgg agcccttcaa gagaagggc gaggtgcgcc gtccaccct
661 gagctgcct cgcgagatcc cctggtgaa gggggcaag cccgacgtgg tgcagatcgt
721 ggcgaactac aacgcotaco tgcgcgccag cgacgacctg cccaagatgt tcatcgagag
781 agaccccgga ttcttcagca acgcatcgt gaggggcgcc aagaagtccc caacacccga

841 gttcgtgaag gtgaagggcc tgcacttcag ccaggaggac gctccggacg agatgggcaa
901 gtacatcaag agcttcgtgg agcgcgtgct gaagaacgat acgtaaggat cccg

//

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.